

Série A, n° 229.

N° D'ORDRE

847

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. FÉLIX MESNIL

Ancien élève de l'École normale Supérieure,

Agrégé des Sciences naturelles,

Préparateur de microbie morphologique à l'Institut Pasteur.

1^{re} THÈSE. — SUR LE MODE DE RÉSISTANCE DES VERTÉBRÉS INFÉRIEURS

AUX INVASIONS MICROBIENNES ARTIFICIELLES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

ACAD.
LUGD. BAT.
BIBL.

Soutenues le 6 juin 1895, devant la Commission d'examen.

MM. G. BONNIER, *Président*.

DASTRE. }
MUNIER-CHALMAS, } *Examineurs.*

SCEAUX

IMPRIMERIE CHARAIRE ET C^{ie}

68-70, RUE HOUDAN, 68-70

1895

ACADÉMIE DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

MM.

DOYEN		DARBOUX, professeur. Géométrie supérieure.
PROFESSEUR HONORAIRE	}	PASTEUR.
		DE LACAZE-DUTHIERS. Zoologie, Anatomie, Physiologie com- parée.
		HERMITE Algèbre supérieure.
		TROOST Chimie.
		FRIEDEL Chimie organique.
		TISSERAND Astronomie
		LIPPMANN Physique.
		HAUTEFEUILLE Minéralogie.
		BOUTY Physique.
		APPELL Mécanique rationnelle.
		DUCLAUX Chimie biologique.
PROFESSEURS		BOUSSINESQ. Mécanique physique et expérimentale.
		PICARD Calcul différentiel et intégral.
		POINCARÉ. Calcul des probabilités, Physique mathématique.
		YVES DELAGE. Zoologie, Anatomie, Physiologie com- parée.
		BONNIER Botanique.
		DASTRE Physiologie.
		DITTE Chimie.
		MUNIER-CHALMAS Géologie.
		GIARD Zoologie, Évolution des êtres organisés.
		WOLF. Astronomie.
		CHATIN Zoologie, Anatomie, Physiologie com- parée.
PROFESSEURS ADJOINTS		JOLY Chimie.
		PELLAT Physique.
		KOENIGS. Cinématique.
		PAINLEVÉ Calcul différentiel et intégral.
SECRÉTAIRE		FOUSSEREAU.

A MONSIEUR PASTEUR

Hommage de très respectueux attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR METCHNIKOFF

Hommage de vive reconnaissance de son Élève très dévoué.

SUR LE MODE DE RÉSISTANCE
DES
VERTÉBRÉS INFÉRIEURS AUX INVASIONS MICROBIENNES
ARTIFICIELLES

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ

INTRODUCTION

L'étude microbienne des maladies contagieuses a permis d'aborder fructueusement un certain nombre de problèmes du plus haut intérêt pour la pathologie générale. Parmi eux, il n'en est pas de plus important que celui de l'Immunité. Il n'en est pas de plus complexe, et les travaux de M. Metchnikoff et d'autres savants ont montré quels précieux renseignements peut fournir, à ce sujet, l'étude des vertébrés inférieurs et même des invertébrés. Chez les animaux à température variable, il y a, en effet, des différences assez importantes dans la réaction contre les invasions microbiennes, quand la température de l'expérience varie.

Les phénomènes de leucocytose et de phagocytose se produisent moins vite que chez les mammifères, et il est ainsi plus facile d'en saisir le détail et l'enchaînement.

Depuis que plusieurs savants font intervenir dans l'explication de l'immunité le rôle bactéricide de certaines granulations protoplasmiques, les vertébrés inférieurs rendent un autre service. Une simplicité plus grande dans les espèces cellulaires qui peuvent jouer un rôle microbicide, permet de préciser, par analogie, le rôle de ces cellules chez les vertébrés supérieurs où l'on rencontre souvent différentes espèces juxtaposées.

Enfin, cette étude donne des renseignements intéressants sur la Physiologie générale des éléments mésodermiques.

Toutes ces considérations m'ont amené à prendre pour objet de mon travail des vertébrés appartenant aux trois classes à température variable.

Ce travail a été exécuté à l'Institut Pasteur sous la direction de M. Metchnikoff. Je ne saurais trop remercier mon excellent maître de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à cette étude, des précieux conseils qu'il m'a prodigués, et de la complaisance avec laquelle il a examiné toutes mes préparations.

Je ne saurais oublier non plus que M. Roux m'a souvent aidé de sa haute expérience bactériologique.

SUR LE MODE DE RÉSISTANCE DES VERTÉBRÉS INFÉRIEURS AUX INVASIONS MICROBIENNES ARTIFICIELLES

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ

I. — HISTORIQUE.

M. Koch (27), en 1876, dans son célèbre mémoire sur l'étiologie du charbon, note le fait de la résistance des grenouilles à l'inoculation du *Bacillus anthracis*. Il injecte des morceaux de rate de souris mortes du charbon dans le sac lymphatique dorsal, et il est frappé par les faits suivants :

1° Le morceau de rate est bientôt entouré d'un enduit protecteur de cellules rondes ;

2° Certaines de ces cellules contiennent des bactériidies à leur intérieur, et M. Koch suppose même que quelques-unes se sont développées dans la cellule ;

3° Toutes ces bactériidies disparaissent au bout d'un certain temps ; mais il y en a encore 10 jours après l'inoculation.

La température des grenouilles, dans nos pays, étant peu favorable au développement du bacille charbonneux, il devait venir à l'idée de quelqu'un de chercher si la grenouille, à une température plus élevée, ne contracterait pas le charbon.

M. Gibier (15) annonce, en effet, en 1882, dans une courte note, que 5 grenouilles sur 20 inoculées avec la bactériдие et mises dans l'eau à 35-37° ont pris le charbon : il trouve des bacilles abondants dans le foie et le sang.

Jusqu'en 1884, personne ne reprend l'étude des phénomènes observés par MM. Koch et Gibier. Mais les recherches sur les maladies infectieuses font, en peu d'années, des progrès considérables, et on voit naître des théories essayant d'expliquer l'immunité naturelle ou artificielle, l'action des virus et des vaccins.

Les nombreux travaux de M. Metchnikoff, dans toutes les branches de la zoologie, l'amènent à concevoir la grande généralité de ce fait, déjà entrevu par plusieurs observateurs, que certaines cellules du corps des animaux ont la propriété d'englober des parties de l'organisme en état de nécrose, et aussi des éléments étrangers. Il constate que les microbes, eux aussi, sont englobés par les cellules « *phagocytes* », dans lesquels ils disparaissent ensuite peu à peu. De là l'idée que, chez les animaux réfractaires aux invasions microbiennes, ce sont les phagocytes qui sont chargés de débarrasser l'organisme des microbes envahisseurs; — de là l'immunité expliquée par la phagocytose. Arrivé à cette conception théorique de l'immunité, M. Metchnikoff s'applique à montrer, par les exemples les plus variés, qu'elle est bien d'accord avec les faits.

Nous ne retiendrons de ces travaux que ceux qui ont trait plus spécialement à notre sujet.

En 1884, M. Metchnikoff (38) étudie le mode de résistance des grenouilles inoculées du charbon. Il opère comme M. Koch, dont il confirme les observations en les précisant. Il montre que l'exsudat cellulaire qui entoure les fragments d'organes charbonneux est formé par des leucocytes. — Ces leucocytes dévorent activement les microbes. Au bout de quelques jours, les bactériidies que l'on observe dans leur intérieur ont des formes anormales et dégénérées. Elles perdent aussi leur virulence: au bout de 5 jours, la lymphe de grenouille ne tue plus le lapin. M. Metchnikoff reprend aussi les expériences de M. Gibier; il inocule 15 grenouilles et les place à 38°; toutes meurent en 1 à 3 jours, et 6 d'entre elles montrent dans leur sang et leurs organes une végétation bactérienne plus ou moins abondante. Chez les grenouilles chauffées, la leucocytose est faible, la phagocytose aussi; les microbes englobés ne croissent pas et dégèrent; mais il n'en est pas de même des microbes libres.

Pour M. Metchnikoff, la conclusion à tirer de ces faits est que les leucocytes constituent un milieu défavorable pour les bacilles charbonneux, mais que le contraire est vrai pour les liquides de la grenouille. Cette conclusion est tout à fait opposée aux idées de M. Koch, qui regardait les leucocytes comme un bon milieu de culture pour la bactériidie.

La théorie de M. Metchnikoff ne tarde pas à être vivement

critiquée; d'autres explications de l'immunité sont formulées. Tous les savants reconnaissent d'ailleurs la valeur des arguments tirés de l'étude du savant russe sur la grenouille.

Aux premières critiques contre sa théorie, M. Metchnikoff (39) répond en mettant bien en évidence que « l'humeur » de la grenouille, seule, n'a pas d'action dans la destruction des bactériidies. L'humeur aqueuse de l'œil est un milieu pauvre en leucocytes; non seulement la bactériдие n'y est pas détruite, mais ses spores y germent en longs articles; 18 à 24 heures après l'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil, les leucocytes commencent à affluer, englobent et digèrent les microbes.

Mais l'humeur aqueuse peut avoir une composition différente du plasma lymphatique. Aussi M. Metchnikoff montre-t-il que les spores charbonneuses germent dans un sac préparé avec la moelle du *Phragmites communis*, et mis sous la peau du dos de la grenouille. Le plasma lymphatique pénètre dans le sac et une belle végétation bactériidienne se produit. Au contraire, les spores portées directement dans le sac dorsal, sans être protégées, sont englobées ou bien à l'état de spores, ou bien à l'état de bâtonnets très courts. Les leucocytes les englobent sans leur laisser le temps de donner de longs articles.

La question semble donc résolue sans conteste, et M. Hueppe, convaincu par l'évidence des faits, voit là l'*experimentum crucis* de la théorie phagocytaire de l'immunité.

M. Lubarsh (30), dans un 1^{er} mémoire, conclut dans le même sens, en s'attachant surtout à ce fait que les bacilles, avant de mourir, perdent leur virulence. Il prétend même que l'atténuation a lieu pour les bacilles extracellulaires seulement. En effet, quand on fait une injection de microbes par la veine abdominale, l'englobement par les phagocytes est bientôt complet, et il n'y a pas atténuation.

En cette même année 1888, l'explication donnée par M. Metchnikoff de l'immunité naturelle de la grenouille pour le charbon, va être combattue à la fois dans le laboratoire de M. Baumgarten et dans celui de M. Flügge, par les partisans de la doctrine de l'assimilation et par ceux de la propriété bactéricide des humeurs.

A Königsberg, c'est M. Petruschky (51) qui cherche à réfuter les expériences de M. Metchnikoff. Il inocule des cultures de

charbon dans le sac dorsal et conclut de ses observations que :

1° Tous les microbes ne sont pas englobés ;

2° Des phénomènes de dégénérescence se produisent de préférence chez les microbes libres ;

3° La lymphe de la grenouille, alors que tous les microbes ne sont pas englobés, ne tue plus la souris.

Cette atténuation est d'ailleurs passagère, car des cultures sur gélose donnent des colonies charbonneuses virulentes. M. Petruschky trouve à côté de ses colonies de charbon des colonies d'autres microbes ; et c'est sans doute à ces impuretés qu'est dû l'insuccès de ses inoculations de lymphe. Il revient aussi à l'idée de M. Koch que les leucocytes constituent un milieu favorable pour la bactériodie charbonneuse.

M. Petruschky reprend l'expérience des tubes de moelle de roseau sous une autre forme ; il emploie des boudins de grenouille, séchés et débités en petits tubes bien clos ; il les remplit de culture de charbon en milieu liquide. Il trouve seulement une petite quantité de bacilles dégénérés ; au bout de 4 jours, ces bacilles ont encore conservé leur virulence. Il explique cette conservation de la virulence par le liquide de culture qui est resté, et les phénomènes de dégénérescence par le plasma lymphatique qui a pénétré.

Enfin, M. Petruschky examine l'action d'une température élevée sur les grenouilles inoculées avec des bacilles ou des spores. Dans le 1^{er} cas, la mort survient dès 25 ou 30° ; dans le second à 35-37° seulement. Il y a phagocytose au point d'inoculation, mais plus faible que chez les grenouilles à 15-20°.

Ceci s'explique, dit M. Petruschky, par le fait que, dans toutes les cultures, il y a des microbes moins vivants que les autres ; ceux-là ne supportent pas la transplantation sur un autre milieu. Chez les grenouilles chauffées, cela n'est vrai que pour une petite quantité de microbes ; pour les grenouilles froides cela est vrai pour tous. Ainsi donc, M. Petruschky croit à une mort des microbes à 15-20° par suite du mauvais milieu nutritif.

Pour expliquer la croissance des bactériodies chez les grenouilles chauffées, il donne à choisir entre deux hypothèses :

1° Celle de l'assimilation, d'après laquelle le corps des grenouilles est un milieu nutritif suffisant pour les bacilles et les

spores à 28-30°, pour les « Keimlingen der Sporen » seulement à 35-37° ;

2° Celle du pouvoir bactéricide (Gifttheorie) : une substance bactéricide existerait chez la grenouille, mais elle n'empêcherait pas le développement du charbon à 28-30°.

Pourquoi? C'est ce que M. Petruschky ne dit pas ; on ne voit pas non plus pourquoi il a des préférences pour la Gifttheorie.

Ces préférences sont plus accentuées dans un second mémoire (52) : ce serait la présence de l'acide carbonique qui empêcherait la croissance des bactéries ; à 30°, la concentration de cet acide étant plus faible, le développement pourrait avoir lieu.

Ces travaux, exécutés sous la direction de M. Baumgarten (1), sont approuvés par le professeur de Königsberg qui, lui, penche pour la théorie de l'assimilation.

Dans le laboratoire de M. Flügge, à Breslau, de nombreux élèves travaillent à démolir les diverses théories de l'immunité, aussi bien celle de l'épuisement d'une substance utile, que celle de l'adjonction d'une substance nuisible, et autant ces théories chimiques que la théorie cellulaire de la phagocytose.

Nous ne retiendrons de ces travaux que celui de M. Bitter (3) consacré uniquement à la critique de la théorie de M. Metchnikoff, et celui de M. Nuttall.

M. Nuttall (48-49) reprend les expériences de M. Metchnikoff sur les grenouilles. Comme lui, il inocule des morceaux d'organes charbonneux dans le sac lymphatique dorsal.

Il ne nie pas l'importance de la phagocytose au point d'inoculation ; mais il observe qu'il y a toujours autant de microbes extracellulaires que d'intracellulaires ; que la dégénérescence va aussi vite pour les uns que pour les autres ; qu'il y a toujours parallélisme entre la rapidité d'apparition des phénomènes de dégénérescence des bactériidies et la rapidité d'englobement par les leucocytes. Et de cet ensemble d'observations, il conclut que les bacilles pris par les leucocytes sont morts ; le plasma lymphatique aurait donc détruit les bactériidies et les leucocytes seraient de simples nécrophages.

Pourtant, certains faits signalés par M. Nuttall semblent plaider contre sa manière de voir.

Ainsi, après avoir opéré à 10-16°, il fait des expériences à

23° et il constate que les microbes poussent un peu. Malgré cela, la proportion des microbes intracellulaires aux extracellulaires est la même. Il semble donc, comme le fait remarquer M. Duclaux (9), que, puisque l'action des leucocytes augmente suivant les besoins, ils servent à quelque chose.

Contrairement à l'opinion de ses prédécesseurs, M. Nuttall déclare qu'il n'y a pas atténuation de la bactériémie dans le corps de la grenouille. Aux températures basses de ses premières expériences, la lymphe, extraite 17 jours après l'inoculation, tue la souris sans retard sur le témoin.

A haute température, les expériences paraissent moins nettes; à 25-30°, la majorité des grenouilles succombent déjà, avec une faible phagocytose. A 35-37°, les grenouilles n'ont jamais vécu plus de 14 heures.

Après avoir démolì, M. Nuttall cherche à reconstruire. Il explique l'immunité naturelle de la grenouille pour le charbon, par le pouvoir bactéricide des humeurs de cet animal. C'est le moment où la théorie de M. Fodor commence à être en honneur, et M. Nuttall cherche à l'appuyer par un certain nombre de faits tirés de la façon dont les bactériémies se comportent dans des gouttes de sang d'animaux variés.

L'année 1888 ne se termine pas sans une réfutation des faits avancés par MM. Petruschky et Nuttall. M. Metchnikoff reprend les expériences des deux savants allemands. Il constate que la virulence de la bactériémie se conserve beaucoup plus longtemps dans les boyaux employés par M. Petruschky qu'en dehors de ces boyaux. Quant aux bacilles dégénérés, il est probable que M. Petruschky les introduisait lui-même dans le boyau, puisqu'il se servait d'une culture en bouillon où ces formes ne sont pas rares.

M. Metchnikoff (40), en opérant avec du sang d'un cobaye venant de succomber au charbon, ne constate pas de formes d'involution, même au sixième jour. En introduisant des spores dans le boyau, il constate aussi que ces spores donnent un beau développement de charbon, et, au bout de quelques jours, apparaissent des formes dégénérées, comme il s'en produit toujours dans les meilleurs milieux de culture. Enfin, M. Metchnikoff, pour répondre à cette objection possible que les diastases bactéricides du plasma peuvent ne pas traverser les parois du boyau,

emploie du papier buvard plié ; il y met des spores. Le plasma arrive au contact des spores avant les leucocytes ; et les résultats observés concordent avec ceux des boyaux.

Dans son premier travail, M. Metchnikoff avait d'ailleurs indiqué que les spores, mises directement sous la peau du dos, sont englobées à l'état de spores, ou de *bâtonnets courts*. C'était admettre implicitement que le plasma n'empêche pas leur croissance.

M. Trapeznikoff (59), plus tard, reprend la question avec beaucoup de soin, et montre que, sauf à des températures basses comme 12-14°, il y a bien croissance des spores en bâtonnets dans le plasma lymphatique ; mais que cette croissance est vite interrompue, les courts bâtonnets formés étant englobés par les leucocytes.

Le charbon pousse donc bien dans le liquide de la lymphe ; c'est un point hors de conteste, et il est étonnant que M. Lubarsh, dans son dernier mémoire (36), nie le fait et en tire une objection contre l'explication de l'immunité de la grenouille par la phagocytose.

Il est un autre point qui paraît également bien établi : c'est que les leucocytes sont pour quelque chose dans la destruction des bactéries.

Leur rôle est-il important ? C'est sur ce point que porte la réponse de M. Metchnikoff à M. Nuttall. La proportion des microbes englobés aux microbes libres n'augmente pas avec le temps, dit M. Nuttall. Mais les nombres qu'il donne avec un si grand cachet d'exactitude sont entachés d'erreur pour deux raisons :

1° Les rates charbonneuses sont difficilement pénétrables par les bactériidies ;

2° Les préparations de M. Nuttall sont mal faites : ses figures prouvent qu'il a observé des leucocytes en mauvais état ; beaucoup ont dû se briser dans les manipulations, surtout ceux bourrés de microbes, et les bactériidies qu'ils contenaient sont comptées comme libres.

En somme, dit M. Metchnikoff (et plus tard M. Lubarsh (35) appuiera cette opinion), il est fort difficile d'avoir une idée des microbes englobés et libres. — Tout ce que M. Metchnikoff affirme, c'est que les leucocytes ont un rôle important dans la

destruction des microbes; et c'est la seule partie de l'organisme pour lequel ce rôle soit incontestable.

M. Nuttall prétend aussi que l'humeur aqueuse a des propriétés bactéricides en goutte pendante. M. Metchnikoff montre qu'il n'en est rien chez la grenouille et les animaux immunisés.

Nous ne reviendrons pas sur la critique que M. Metchnikoff (42) a faite du mémoire de M. Fahrenholtz (1889).

Plus intéressant est le travail de M. Lubarsh (32) de la même année, dont les résultats ont été repris et développés dans son long mémoire de 1891.

Il est d'accord avec M. Metchnikoff sur la présence et l'importance de la phagocytose chez les grenouilles inoculées du charbon.

Mais il est convaincu que chez ces grenouilles et chez les torpilles, où la phagocytose est active, elle ne suffit pas à elle seule à expliquer l'immunité. Il y a toujours, dit-il, un reste de bacilles charbonneux extracellulaires.

Bien plus, les leucocytes de la grenouille ne réagissent pas contre les bacilles de la septicémie des souris; et pourtant la grenouille a l'immunité contre cette maladie; les souris, qui ne l'ont pas, montrent à la mort de nombreux bacilles dans leurs cellules blanches.

Les ascidies et les crustacés résistent au charbon et présentent pourtant une bien faible phagocytose. De tout cela résulte clairement, pour M. Lubarsh, que d'autres facteurs que la phagocytose doivent entrer en ligne de compte dans le mécanisme de l'immunité.

Toutes ces prétendues exceptions contre la phagocytose seront détruites peu à peu. M. Kowalewsky (28) a montré en effet que, pour les invertébrés, et en particulier les crustacés visés par M. Lubarsh, il y a bien résistance phagocytaire, mais elle se localise dans certains organes que l'auteur allemand n'a pas observés.

La théorie bactéricide des humeurs, vite battue en brèche, a un moment fait place à une théorie atténuante des humeurs.

Naturellement on a cherché à expliquer l'immunité des grenouilles par cette théorie. Certains faits avancés par les auteurs y prêtaient d'ailleurs: MM. Metchnikoff (38), Lubarsh (30), Petruschky (51), Fischel (12), s'accordaient pour affirmer que les

bacilles charbonneux s'atténuent assez rapidement dans le corps de la grenouille. Il n'y avait plus qu'à prouver que cette atténuation est due à l'humeur de la grenouille ¹. M. Sanarelli (37) s'attache uniquement à démontrer ce fait, et, en expérimentant surtout *in vitro*, il établit que la lymphe, débarrassée de ses leucocytes, enlève toute virulence aux bacilles charbonneux en 1 à 2 jours, et aux spores en 2 à 3 jours. Mais il ne cherche pas à faire concorder ces faits soigneusement observés avec ce qui se passe chez l'animal vivant pour la bactériémie au contact de la lymphe *in vivo*. Nous verrons que les choses se passent différemment.

En tout cas, M. Sanarelli déclare que l'atténuation observée est passagère. En passant de la lymphe sur gélose, on a des colonies qui ont recouvré la virulence primitive.

MM. Ogata et Jasuhara (50) arrivent aux mêmes résultats que M. Sanarelli. — Ils prétendent même que la lymphe de grenouille inoculée à des souris, en même temps que le charbon, ou à un moment variant entre 72 heures avant et 5 heures après, empêche ces animaux de contracter la maladie mortelle. M. Roudenko (55) a montré l'inexactitude de ces résultats.

Jusqu'ici, nous avons assisté à la lutte entre ceux qui veulent voir dans les cellules de l'organisme le siège de l'immunité, et ceux qui le recherchent dans les humeurs du corps.

Depuis 2 ans, les humoristes ont fait des concessions à leurs adversaires, et, tout en maintenant le rôle bactéricide des humeurs, ils admettent que les substances bactéricides, les alexines, sont secrétées par les leucocytes. M. Hankin (16) s'est fait l'apôtre de cette nouvelle théorie, et a voulu l'appuyer sur des faits solides en déterminant quels étaient les leucocytes producteurs d'alexines, les *alexocytes*. — D'expériences compliquées et qui ne paraissent avoir donné de résultats que chez le lapin, il conclut que ce sont les granulations éosinophiles (en réalité il s'agit de granulations pseudo-éosinophiles, comme M. Metchnikoff (45) l'a fait remarquer, et comme M. Hankin (17) lui-même le reconnaît dans un 2^e mémoire) qui constituent l'alexine. Ces glandes minuscules sécrètent leur poison dans le plasma quand il en est besoin.

1. Nous avons déjà cité une preuve indirecte donnée par M. Lubarsh.

Des compatriotes de M. Hankin ont cherché à appliquer la nouvelle théorie au cas de la grenouille. Jusque-là les auteurs ne s'étaient pas préoccupés de la qualité des leucocytes qui apparaissent dans le sac dorsal après l'inoculation. MM. Kanthack et Hardy (23), en appliquant les méthodes d'Ehrlich, ont reconnu qu'une proportion notable des globules blancs de l'exsudat était constituée par de vrais éosinophiles, et ils ont cherché à établir que :

1° Les microbes sont d'abord entourés par une sorte de plasmodium d'éosinophiles; ils sont tués par le contenu des glandes éosinophiles secrété en dehors des cellules;

2° Postérieurement à cette mort, les microbes sont englobés par les leucocytes ordinaires.

C'est une façon toute nouvelle d'expliquer l'immunité de la grenouille contre les invasions microbiennes.

Les arguments les plus importants que les auteurs anglais émettent en faveur de leur doctrine sont malheureusement tirés en grande partie d'expériences *in vitro*. Ils prennent une goutte de lymphe et l'ensemencent avec une espèce microbienne, la bactériidie charbonneuse par exemple. La préparation est observée en goutte pendante : ils décrivent des plasmodies de cellules éosinophiles entourant les microbes; puis des plasmodies de cellules hyalines.

Aucun des nombreux savants qui ont étudié la réaction de la grenouille contre la bactériidie charbonneuse n'a ni figuré ni décrit de semblables associations de leucocytes. — MM. Kanthack et Hardy ont dû avoir affaire à des produits artificiels.

Ils parlent bien d'expériences sur l'animal vivant, de charbon inoculé dans le sac lymphatique dorsal, et de lymphe retirée à des heures variables après l'inoculation. Mais de ces expériences ne ressort aucun argument convaincant en faveur de leur suggestive hypothèse. Ils disent, il est vrai, que les premiers leucocytes attirés par les microbes sont uniquement des éosinophiles. Ce fait, à lui seul, ne prouve rien. Dans un nouveau mémoire (24), ces savants cherchent à étendre leurs conclusions au mode de réaction d'un grand nombre de mammifères; mais ils emploient toujours le même genre de preuves.

De tout cet ensemble de travaux, dont j'ai cherché à mettre en évidence les faits généraux, il résulte que, pour expliquer

l'immunité des grenouilles contre le charbon à la température ordinaire (15-20°), on ne nie plus guère l'intervention des leucocytes.

Je me suis attaché, dans cette étude, à montrer que cette intervention est une action phagocytaire, au sens que M. Metchnikoff a attaché à ce mot en le créant.

J'ai examiné cette action chez les poissons où les leucocytes intervenant sont d'une seule sorte; puis chez la grenouille où la présence des éosinophiles rend plus complexe l'interprétation des phénomènes.

J'ai vérifié les faits paradoxaux avancés par M. Lubarsh concernant la réaction des grenouilles vis-à-vis de la septicémie des souris.

J'ai cherché à me rendre compte de la façon dont se comporte la bactériémie dans le corps de la grenouille à 33°.

Enfin, j'ai rassemblé quelques documents nouveaux éclairant un peu l'histoire encore si obscure des cellules éosinophiles.

II. — PROCÉDÉS DE RECHERCHES.

A. — Les deux microbes qui ont servi dans ces recherches sont la bactériémie charbonneuse et le bacille de la septicémie des souris.

1° Du premier, j'ai utilisé la forme ordinaire à spores et une variété asporogène préparée par le procédé des bouillons phéniqués de M. Roux.

Quand on examine la question de savoir si le charbon s'atténue dans le corps de l'animal inoculé, ou en gouttes pendantes, il est nécessaire de contrôler les expériences faites avec du charbon à spores, par d'autres faites avec de l'asporogène, car on pourrait objecter aux premières que les spores des cultures ont conservé la virulence primitive; et il est beaucoup plus commode de se servir de cultures que du sang d'un animal charbonneux.

J'ai utilisé des cultures faites sur gélose nutritive de la composition suivante :

Eau.....	1,000
Peptone.....	15
Sel marin.....	5
Gélose.....	15

Ces cultures provenaient généralement de l'ensemencement du sang d'un animal charbonneux (cobaye ou lapin); de cette façon on a une idée assez exacte de la virulence de la bactériodie employée.

Cette bactériodie devait tuer un lapin de poids moyen (1^{kg},500 à 2 kilos) entre 24 et 48 heures. Avec le charbon à spores, j'employais toujours des cultures d'un jour pour avoir de beaux bâtonnets se colorant d'une façon bien uniforme et peu de spores. J'ai exceptionnellement usé de cultures d'asporogène de deux jours. Une culture était diluée dans 6 à 8 c. c. de bouillon de veau ordinaire;

2° Le bacille de la septicémie pousse mal sur tous les milieux solides. Je me suis contenté de cultures en bouillon de veau peptonisé à 1 0/0, de 1 à 2 jours. La culture n'est jamais très abondante; mais les résultats de l'inoculation de 1 c. c. aux grenouilles ont été si nets qu'il a paru inutile de chercher un meilleur milieu nutritif.

B. — Mes préparations ont été surtout des préparations de lymphes, faites suivant le procédé recommandé pour le sang.

Les organes à couper étaient fixés à l'alcool absolu, quelquefois aussi par le sublimé à saturation et acide. Mais par ce dernier procédé les granulations acidophiles ne prennent plus aussi bien la teinte de l'éosine. Les organes étaient ensuite inclus dans la paraffine et colorés sur lames.

C. — Le meilleur mode de coloration de la lymphe est le suivant. Colorer 5 minutes dans la solution :

Alcool à 66°.....	100
Eosine à l'eau.....	0,5

Laver à l'eau. Colorer 15 à 20 secondes dans une solution aqueuse à 3 0/0 de bleu de méthylène.

Laver très soigneusement à l'eau et laisser sécher; puis monter au baume. Les granulations éosinophiles et l'hémoglobine se colorent en rose; les noyaux et les microbes en bleu plus ou moins intense; le protoplasme en bleu très clair.

Quelquefois la coloration à l'éosine, suivie d'un passage au Gram, est excellente pour permettre d'apercevoir facilement les microbes dans une préparation. Enfin, j'ai quelquefois employé

le picro-carmin pour colorer les noyaux, et le Gram pour les microbes.

Pour les coupes, la coloration au bleu de méthylène ne donne pas de bons résultats. Une double coloration à l'éosine Gram permet de mettre bien en évidence les grains acidophiles et les microbes; mais les noyaux sont peu ou point nets.

Un bon procédé est celui qui consiste à colorer les microbes par la méthode de Gram, et à porter ensuite la coupe un quart d'heure à une demi-heure dans le liquide de Biondi-Heidenhain (mélange d'aurantia, de vert de méthyle et de fuchsine acide). Mais il faut que la fuchsine acide ne soit pas en excès dans le liquide, car alors les microbes se décolorent; on s'en aperçoit d'ailleurs facilement, les granulations éosinophiles prenant alors la teinte fuchsine. Quand la fuchsine est en proportion convenable, les granulations α prennent une teinte jaune brunâtre, l'hémoglobine une teinte jaune orange, les noyaux se colorent en vert et le protoplasme est grisâtre. On a ainsi, différenciés, tous les détails des cellules.

Enfin je me suis servi de coupes colorées quelques heures dans le carmin boracique de Grenacher, puis décolorées quelques minutes dans l'alcool chlorhydrique. On a alors une bonne coloration des noyaux des cellules, avec éléction de la couleur très nette sur la chromatine. Les cellules à granulations sont reconnaissables. Les microbes sont ensuite colorés par la méthode de Gram.

III. — RÉACTION DES POISSONS A LA BACTÉRIE.

Les grenouilles ont été très étudiées, sans doute à cause de la facilité de les conserver vivantes et aussi de leur manipulation fort simple. Les poissons l'ont été moins. M. de Giaxa (14), en recherchant la façon dont certains microbes pathogènes pour les vertébrés supérieurs se comportent dans l'eau de mer, a fait avaler du charbon à divers poissons, et a constaté que, au bout de quelques heures, on ne retrouvait que bien peu de microbes.

M. Lubarsh (32, 33), au laboratoire de Naples, a expérimenté sur plusieurs espèces de poissons, mais toutes appartenant aux Elasmobranches : *Torpedo marmorata* et *ocellata*, *Scyllium canicula* et *catulus* et *Raja*. Les injections étaient faites sous la peau

du dos quand cela était possible (raies et torpilles), sinon dans le péritoine.

Les résultats de M. *Lubarsh* sont peu nets; et ils se résument assez complètement par la dernière phrase de son exposé: « Dans tous les cas, on ne saurait douter que les bacilles introduits ne meurent peu à peu, et que les phagocytes ne prennent au moins quelque part à cette mort. »

Ses expériences n'ont d'ailleurs pas toujours été couronnées de succès, comme il le déclare pour les squales.

Il n'a pas recherché si la lymphe avait un pouvoir bactéricide ou atténuant chez l'animal vivant ou *in vitro*. Enfin il n'a pas étudié d'une façon spéciale les leucocytes du point d'inoculation.

Dernièrement MM. *Sabrazès* et *Colombot* (56) ont inoculé des Hippocampes, et constaté ce fait intéressant que, à la température de 14 à 26°, ce poisson prend le charbon. Malheureusement, et ces auteurs l'ont bien remarqué, ce ne peut être là qu'une exception, explicable par ce seul fait que la proportion des globules blancs est relativement très faible.

J'ai cherché à élucider la façon dont les poissons résistent aux inoculations de charbon. Malheureusement, ces recherches n'ont pu porter que sur des Téléostéens; mais je me suis attaché à montrer la grande généralité des faits observés. Mes expériences ont porté principalement sur *Gobio fluviatilis* et *Perca fluviatilis*. J'ai opéré aussi sur quelques *Carassius auratus*. Ces derniers mesuraient une dizaine de centimètres; la longueur des autres variait entre 15 et 30 centimètres. Ces poissons vivaient longtemps dans un cristallisoir où l'eau se renouvelait constamment; la température était celle de l'eau du robinet: elle a varié, durant la période des expériences, de 15 à 20°, et n'a jamais dépassé ce dernier chiffre. Pour opérer à une température plus élevée (22 ou 23°), je mettais les poissons dans un cristallisoir rempli d'eau bien pure à cette température. Ils y vivaient plusieurs jours dans de très bonnes conditions.

Tous mes poissons étaient inoculés dans la cavité péritonéale, sur la ligne médiane, à 2 ou 3 centimètres de l'anus, c'est-à-dire dans la région où le tube digestif est rectiligne; je perçais obliquement la paroi du corps et j'inoculais 0,2 c. c. à 0,4 c. c. d'une dilution de culture charbonneuse sur gélose, dans du bouillon.

Les écailles du poisson fermaient la plaie, et les bactéries de l'eau ou de la surface de l'animal ne pénétraient que rarement à l'intérieur du corps, comme la suite de l'expérience le montrait.

Au bout d'un temps variable, j'introduisais dans la cavité péritonéale l'extrémité amincie d'une pipette flambée, et je retirais une certaine quantité de lymphé qui servait à faire soit des lames colorées, soit des gouttes pendantes, soit enfin des inoculations à des cobayes.

Les poissons, placés dans les conditions indiquées, résistent généralement aux injections charbonneuses, et j'en ai conservé plusieurs mois dans leur petit aquarium.

Quelques-uns succombaient, mais certainement par accident, soient qu'ils aient été manipulés un peu rudement, soit qu'une maladie parasitaire (due à une saprolégnée ou à une bactérie), ait élu domicile sur leurs écailles.

Les poissons étudiés ne prennent donc pas le charbon. Et leur immunité n'est pas seulement relative, elle est absolue, pourvu que l'animal soit dans de bonnes conditions de vie. Les goujons et les perches inoculés et placés à 23° résistent aussi bien que les autres; et pourtant la température de 23° est très favorable au développement de la bactériidie charbonneuse.

De quelle façon ces poissons résistent-ils au charbon? Si on prend un peu de lymphé au point d'inoculation, quelques heures après l'injection du charbon, on est frappé par ce fait que cette lymphé est très abondante: c'est un liquide trouble, blanchâtre, qui s'élève à une certaine hauteur dans la pipette sans qu'il soit besoin d'aspirer. Il contient en suspension un nombre considérable de globules blancs.

Le lendemain il y a encore de l'exsudat au point d'inoculation, mais en proportion bien moins grande que le premier jour; on en tire à peine une goutte en introduisant le tube effilé¹.

Les jours suivants, l'exsudat diminue de plus en plus, et il est nécessaire d'aspirer fortement pour en retirer une petite quantité.

Donc leucocytose d'abord abondante, puis diminuant graduellement.

Examinons une lame colorée (éosine, bleu de méthylène)

1. Il est bien entendu que ces expériences sont faites à 15-20°. — En expérimentant à 12°, la leucocytose commence bien plus tard, et il faut attendre plus de 12 heures pour avoir un fort exsudat.

faite avec de la lymphe d'un goujon retirée 6 h. 1/2 après l'injection, et au moment de la forte leucocytose. Un certain nombre de cellules contiennent à leur intérieur des microbes : les bacilles libres sont extrêmement rares. Il y a donc, chez ce goujon, déjà au bout de 6 h. 1/2, une phagocytose très nette et presque complète : le nombre des microbes libres est si faible qu'il peut être attribué aux leucocytes éclatés.

La phagocytose n'est pas toujours aussi avancée quelques heures après l'inoculation. Il y a évidemment des différences individuelles ; et surtout, au bout du même temps, la proportion des microbes englobés aux extracellulaires est d'autant plus grande qu'il y a moins de microbes injectés.

Dans le cas cité, il s'agissait d'un gros goujon qui avait reçu 0,7 c. c. d'une culture en bouillon de 1 jour.

D'autres fois, si on examine la lymphe retirée même 17 heures après l'inoculation, on trouve que la moitié des microbes seulement sont intracellulaires. Parmi les cellules renfermant les bactériidies, beaucoup en contiennent un petit nombre. Quelques-unes seulement en sont bourrées ; leur volume a alors doublé ou triplé. Fréquemment on observe autour des microbes des vacuoles.

Quoi qu'il en soit de la rapidité de l'englobement des microbes par les leucocytes, il se fait peu à peu (des préparations faites à des temps de plus en plus éloignés avec la lymphe d'un même poisson le prouvent nettement), et est d'autant plus lent que le moment de l'inoculation s'éloigne davantage. Deux ou trois jours après, on ne trouve plus que quelques microbes libres à côté des microbes englobés¹.

Le lendemain de l'inoculation, on remarque que la plupart des microbes englobés se colorent mal, présentent des phénomènes de dégénérescence ; de certains on ne voit plus que des traces presque méconnaissables. Il y a destruction des microbes par les leucocytes.

De tous ces faits, je crois pouvoir conclure que les microbes finissent toujours par être englobés et détruits par les leucocytes.

A quel état se fait cet englobement ? Je vais montrer :

1^o Que les microbes englobés sont vivants ;

1. Le nombre des microbes libres est si faible qu'ils peuvent provenir de phagocytes éclatés.

2° Qu'ils sont virulents.

Retirons de la lymphe de la manière indiquée, et faisons-en des gouttes pendantes. Si on les place à l'étuve, on constate que, moins de 24 heures après, il s'y produit un abondant développement de charbon. Les bâtonnets, en général isolés ou par chaînes de 3 ou 4 articles au plus, donnent des filaments très longs qui s'enchevêtrent les uns dans les autres. Si les bacilles ne sont pas très nombreux dans la goutte de lymphe, on observe ainsi le lendemain une série de petites colonies. *L'« humeur » du poisson n'a donc pas de propriétés bactéricides à 35°.* A 15-20°, on n'observe pas de changements appréciables dans la goutte : la température n'est pas suffisante pour la croissance de la bactériidie. Mais si on porte la goutte pendante, au bout de 2 ou 3 jours, à l'étuve, on observe un abondant développement. L'humeur du poisson n'a donc pu détruire le bacille charbonneux.

Pendant 2 jours, à 15-16°, les leucocytes continuent à montrer des prolongements pseudopodiques, ils sont encore vivants ; peuvent-ils détruire les bacilles intracellulaires ?

Une expérience m'a permis de répondre à cette question. Une goutte pendante laissée 2 jours dans le laboratoire et contenant presque exclusivement des bacilles intracellulaires, est portée à l'étuve ; le lendemain, elle montre un aussi abondant développement bactéridien que celles portées dès le 1^{er} jour à l'étuve. Donc, après deux jours, il reste encore de nombreux bacilles vivants dans les leucocytes : ces cellules, *in vitro*, ont été certainement atteintes dans leur pouvoir de digestion intracellulaire.

Ainsi donc l'humeur du poisson *in vitro* n'a aucune action bactéricide. Mais peut-être en a-t-elle dans l'organisme vivant. L'expérience que nous venons de citer montre déjà qu'il y a des bacilles vivants dans les leucocytes. Je peux donner deux autres preuves qu'une telle action n'existe pas :

1° Même 8 jours après l'inoculation, on trouve encore des bactériidies vivantes dans le corps du poisson, ainsi qu'on peut s'en assurer en ensemençant de la lymphe sur gélose : on a quelques colonies ;

2° Dans les gouttes pendantes, on observe assez facilement des microbes englobés par les leucocytes. Si on met une goutte pendante à l'étuve, on constate qu'au bout de 5 ou 6 heures, une

partie des bactériidies contenues à l'intérieur des leucocytes commencent à croître : 24 heures après, elles ont fait éclater complètement le leucocyte, et ont donné naissance à une belle colonie.

Nous pouvons donc affirmer que le plasma lymphatique de poisson n'a pas de propriétés bactéricides ni *in vitro*, ni dans l'organisme vivant ; et que les microbes sont bien englobés à l'état vivant par les leucocytes. — On peut même dire que, *in vitro*, l'humeur du poisson constitue un bon milieu de culture pour la bactériдие.

Montrons maintenant que le plasma du poisson n'a pas de propriété atténuante.

Les expériences ont porté sur plusieurs goujons, perches et poissons rouges, et ont été faites, sauf les dernières, avec un bacille charbonneux, à spores, très virulent (tuant sûrement un lapin entre 24 et 48 heures). — Ces poissons ont servi à deux séries d'expériences :

1° On prend, avec une pipette effilée, un peu de lymph, qu'on inocule à des cobayes ;

2° Avec de la lymph prélevée 6 ou 8 heures après l'inoculation, on fait des gouttes pendantes, qu'on conserve un temps variable, à 15-20°, ou à l'étuve, et qu'on inocule ensuite à des cobayes.

Ces 2 séries d'expériences permettent de savoir si la bactéridie subit un changement de virulence par suite de l'action de la lymph : 1° chez l'animal vivant ; 2° *in vitro*.

Le cobaye est un animal commode en ce qu'il résiste mieux au charbon que la souris ; le temps que l'animal met à succomber mesure assez bien la virulence des bacilles injectés à condition que leur nombre soit appréciable¹.

Nous sommes arrivé aux résultats suivants pour la 1^{re} série d'expériences :

1. Voir à ce sujet le travail de M. Lubarsh (32).

ESPECE DE POISSON	TEMPS ÉCOULÉ ENTRE L'INOCULATION et la prise de lymphé.	POIDS DU COBAYE INJECTÉ	TEMPS MIS PAR LE COBAYE à mourir.
Goujon.	6 heures.	450 grammes.	80 heures.
Id.	6 —	450 —	47 —
Id.	8 —	500 —	41 —
Id.	32 —	620 —	74 —
Poisson rouge.	74 —	398 —	52 —
Goujon.	175 —	522 —	61 —
Poisson rouge.	223 —	415 —	44 —
Perche.	31 —	389 —	33 —

Des cobayes inoculés avec un peu de culture sur gélose, d'âge variant entre 2 et 7 jours, sont morts entre 30 et 60 heures.

On voit que la bactériémie n'a pas subi la moindre atténuation, même en restant plus de 9 jours dans le corps du poisson, c'est-à-dire longtemps après son englobement par les leucocytes.

Voyons maintenant si la lymphé *in vitro* a des propriétés atténuantes.

Goujon I. — Lymphé prise 6 h. 1/2 après l'inoculation. Une goutte pendante faite avec cette lymphé et conservée 2 jours à l'étuve tue un cobaye en 39 heures.

Goujon II. — Lymphé prise 6 h. 1/2 après l'inoculation; des gouttes pendantes sont faites avec cette lymphé.

1 goutte conservée 30 h. à l'étuve tue 1 gros cobaye en 63 h 1/2
 « 30 h. « 1 moyen « 54 h.
 « 400 h. « ne tue pas un cobaye de 450 gr.
 « 2 jours dans le laboratoire et 3 jours à l'étuve tue un cobaye de 640 gr. en 69 h 1/2.

Un cobaye de 418 grammes sert de témoin; il est inoculé avec une goutte du même charbon gardé 4 jours sur gélose; il meurt en 40 heures environ.

Goujon III. — Lymphé mise en gouttes pendantes 8 h. après l'inoculation.

1 goutte conservée 1 j. et 8 j. à l'étuve tue 1 cobaye de 510 gr. en 46 h 1/2
 « id. « id. « 32 h.
 « 2 j. et 8 j. laboratoire « 475 gr. « 60 h.
 « id. étuve « 647 gr. « 54 h.
 « 4 jours laboratoire « 401 gr. « 86 h.
 « 7 j. + 6 h. étuve « 352 gr. « 57 h.
 « 9 j. + 6 h. laboratoire « 437 gr. « 66 h.

Les cobayes témoins meurent, celui inoculé avec une culture sur gélose de 2 jours en 34 heures, celui inoculé avec une culture de 6 jours en 52 h. 1/2.

Les expériences sur la perche ont été faites avec du charbon asporogène :
Lymphé prise 7 h. 1/2 après l'inoculation.

1 goutte conservée 2 jours à l'étuve tue 1 cobaye de 600 gr. en 42h.
» 4 » 764 gr. en 50h 1/2.

Un témoin de 716 grammes meurt en 42 heures.

De ce qui précède, on peut conclure que le charbon s'atténue peu, même après un contact prolongé avec la lymphé de poisson. Je n'ai jamais observé l'exaltation de virulence de la bactériémie, comme MM. Sabrazès et Colombot l'ont vu sur l'hippocampe. Pour être complet, je dois ajouter que la lymphé de poisson, ensemencée sur gélose, donne des colonies de bacilles charbonneux de même virulence que ceux du point de départ. Je considère donc comme démontré le fait suivant :

Les bactériémies charbonneuses, introduites dans le corps d'un poisson, sont ingérées à l'état vivant et virulent par les leucocytes, et détruites peu à peu.

Il me reste à étudier les leucocytes du point d'inoculation. Ils sont peu variés de forme. Ce sont des globules de 12 à 15 μ de diamètre, renfermant un protoplasme assez abondant occupant les deux tiers environ de la masse totale. Ce protoplasme se colore faiblement par le bleu de méthylène et d'une façon assez uniforme. Le noyau est en général formé d'une masse unique plus ou moins régulière (fig. 1), se colorant assez fortement par le bleu de méthylène; mais il n'est pas rare d'avoir un noyau en bissac (fig. 2), ou même formé de 2 lobes bien distincts, réunis par un mince filament (fig. 3). Tout à fait exceptionnellement, on trouve des noyaux à 3 lobes.

Il existe donc un type unique de leucocyte dans l'exsudat du point d'inoculation¹, et c'est naturellement ce leucocyte qui est doué de propriétés phagocytaires. Le plus souvent, le nombre des microbes englobés est peu considérable, et quelquefois ces microbes sont dans une vacuole (fig. 7). Quand les bactériémies intracellulaires sont nombreuses, elles sont généralement dans une large vacuole (fig. 5). — Notons enfin que les leucocytes peuvent épouser la forme des longs filaments bactériémiens englobés (fig. 6). — Les microbes intracellulaires sont faciles à

1. Citons seulement pour mémoire les quelques rares lymphocytes qu'on y rencontre.

colorer par le bleu de méthylène, et on peut suivre tous les stades de leur dégénérescence. Ces phénomènes ont été si souvent décrits que nous n'insisterons pas.

Existe-t-il dans l'exsudat péritonéal des cellules à granulations? Jusqu'ici on a trouvé ces cellules chez tous les vertébrés. MM. Kanthack et Hardy (23-24) les signalent chez la lamproie, et également (avec d'autres auteurs) chez l'écrevisse. Nous avons observé avec un soin particulier la perche et le goujon.

Pour la première, la conclusion est des plus nettes; jamais, à aucun moment, ni avant l'inoculation, ni au bout d'un temps variable après, ni chez les animaux nouvellement capturés, ni chez ceux gardés plusieurs mois en captivité (et mourant quelquefois d'affections parasitaires), je n'ai observé de cellules à granulations dans le péritoine, et cela, quel que soit le réactif d'Ehrlich employé. Il n'y en a pas non plus dans le sang.

Les leucocytes du sang sont d'ailleurs ceux que je viens de décrire; la proportion des lymphocytes est simplement plus forte que dans l'exsudat péritonéal: ces lymphocytes n'ayant aucun rôle phagocytaire, il est naturel que leur pouvoir chimiotactique soit faible, sinon nul.

Il est donc certain que chez la perche il ne peut y avoir aucune destruction des microbes par des produits bactéricides secrétés par les granulations cellulaires.

Chez le goujon, notre conclusion doit être analogue *a priori*, étant donnée l'identité des phénomènes observés. Pourtant, chez ce poisson, il existe des cellules à granulations.

Ces cellules sont excessivement rares; quelquefois même on n'en trouve pas du tout. Généralement il en existe une pour 500 ou 1,000 leucocytes du point d'inoculation. Dans un cas, dans la lymphe d'un goujon prise 4 jours après l'inoculation, j'ai trouvé jusqu'à 7 ou 8 de ces cellules.

Ces leucocytes diffèrent seulement des autres en ce que leur protoplasme, au lieu de prendre la teinte bleutée ordinaire, se colore faiblement par l'éosine, mais d'une façon non uniforme; on a tantôt une sorte de carrelage rose dont les diverses pièces sont séparées par des lignes bleues, tantôt de gros granules irréguliers, de forme et de dimensions assez variables¹.

1. Fig. 26 b. de M. Tschernodanoff.

Il ne s'agit donc pas là de véritables éosinophiles au sens d'Ehrlich, mais plutôt de pseudo-éosinophiles.

Quoi qu'il en soit, le fait que ces cellules à granulations manquent souvent, que toujours elles sont rares, exclut la pensée qu'elles puissent avoir un rôle dans la destruction des bactéries.

Dans le sang du *Carassius auratus*, je n'ai pas rencontré non plus de cellules à granulations. J'ai cherché à étendre ces constatations à tout le groupe des Téléostéens.

MM. Sabrazès et Colombot (56) n'indiquent pas d'éosinophiles chez l'hippocampe. Mes préparations de sang m'ont permis de constater la même absence chez un certain nombre de poissons marins : *Merlangus vulgaris*, *Pagellus centrodontus*, *Conger vulgaris*, *Scomber scombrus*, *Platessa vulgaris*.

Chez ces poissons, la forme de leucocyte qui domine est la forme mononucléaire, décrite et figurée chez le goujon et la perche. Les noyaux à 2 lobes sont rares. A côté de ces leucocytes, on trouve toujours un certain nombre de lymphocytes, particulièrement considérable dans le sang du *Conger vulgaris*.

Dans la lymphe prise 24 heures après l'inoculation d'un *Cottus*, j'ai également noté l'absence complète de cellules à granulations.

On peut donc conclure d'une façon générale que les cellules à granulations ne jouent aucun rôle dans la destruction des bactéries chez les poissons téléostéens.

Le sang de la raie renferme un grand nombre de cellules éosinophiles¹. Je n'ai pas eu à ma disposition de raies vivantes pour examiner la réaction contre la bactériémie, mais M. Seisweillo a vu sur cet animal que les éosinophiles ne jouent aucun rôle dans la destruction des microbes charbonneux.

IV. — RÉACTION DES GRENOUILLES A LA BACTÉRIE CHARBONNEUSE ET A LA SEPTICÉMIE DES SOURIS.

Presque tous les auteurs qui ont cherché comment la grenouille réagit vis-à-vis du bacille charbonneux, ont fait leurs inoculations dans le sac lymphatique dorsal ; c'est évidemment là l'endroit de prédilection. La chambre antérieure de l'œil a surtout servi à des expériences de contrôle. Des injections intra-

1. Voir la fig. 25 (dessin gauche) de M. Tschernodanoff.

veineuses n'ont été faites que par MM. Hess, Lubarsh (exceptionnellement) et Voswinkel; je consacrerai à cette étude un paragraphe spécial. Je veux, pour le moment, ne considérer que ce qui se passe dans le sac dorsal quand on injecte, soit le charbon, soit la septicémie des souris.

A. *Charbon*. — J'ai employé des cultures sur gélose diluées dans du bouillon à la dose de 0,5 c. c.

Tous les auteurs s'accordent pour décrire une leucocytose au point d'inoculation, et des microbes intracellulaires. Mais il y a divergence profonde sur le moment où commence la phagocytose.

Pour M. Nuttall (48-49), il n'y a jamais de phagocytose dans les 6 premières heures; pour M. Kanthack (22), jamais dans les 4 premières, et même à la 4^e heure il n'apparaît que des lymphocytes et des éosinophiles.

MM. Petruschky (51) et Fischel (12) ne voient pas de phagocytose dans les 3 premières heures; MM. Klein et Hamer (26) dans les 2 premières. M. Lubarsh (35) a vu suivant les cas, la phagocytose commencer au bout de trois quarts d'heure, 2 heures 1/2, 4 heures.

Dans les conditions de mes expériences à 15-20°, les résultats ont été assez constants.

La phagocytose commence 2 heures ou 2 heures 1/2 après l'injection, et *toujours en même temps que la leucocytose*.

Les leucocytes sont d'abord très rares au point d'inoculation; et quelques-uns renferment des microbes. Puis leur nombre augmente rapidement: 4 heures après l'inoculation, le liquide retiré contient en suspension un nombre considérable de leucocytes. Ce liquide est assez limpide; il n'est jamais trouble comme l'exsudat péritonéal du poisson. On a affaire à de la lymphe assez pure, qui se coagule rapidement. En examinant cette lymphe, fixée et colorée par les procédés indiqués, on constate qu'un nombre considérable de leucocytes, quelquefois même la moitié ont ingéré des microbes. — Le rapport entre le nombre des microbes libres et des microbes ingérés est variable; en moyenne, il est égal à l'unité.

Beaucoup des microbes ont, d'ailleurs, été entraînés loin du point d'inoculation, ont pénétré dans le courant sanguin. La plupart ont dû s'y rendre à l'intérieur des leucocytes, et on les

retrouve à cet état dans les organes. Les microbes libres ne tardent pas à être englobés par les phagocytes fixes des organes.

Après les 5 premières heures, le sac dorsal, jusque-là très succulent, va perdre peu à peu sa lymphe : 12 à 15 heures après l'inoculation, il en donne assez difficilement une goutte. Cette goutte est trouble et blanchâtre. Colorée, elle montre de nombreux leucocytes, mais peu de microbes. La plupart sont donc déjà digérés, puisque, dans les organes, leur nombre est déjà de beaucoup diminué. Ceux qui restent sont en partie intracellulaires, en partie libres. Au bout de 24 heures, le nombre des microbes libres est si faible que ces microbes peuvent provenir de leucocytes éclatés. Il est donc probable que, moins de 48 heures après l'inoculation, tous les microbes libres sont devenus intracellulaires.

L'importance de la leucocytose au point d'inoculation est en rapport : 1° avec le nombre de microbes inoculés ; 2° avec la virulence de ces microbes

1° En injectant quelques gouttes de charbon dans le sac dorsal, ce sac ne devient jamais succulent ;

2° Le même fait s'observe quand on injecte du premier vaccin charbonneux Pasteur.

La chimiotaxie exercée sur les leucocytes est donc d'autant plus grande que la substance attirante est en plus grande quantité.

Comme chez les poissons, on observe donc une phagocytose très importante, et je suis convaincu que tous les microbes libres deviennent intracellulaires. Les microbes présentent souvent des formes d'involution, des phénomènes de dégénérescence, fréquents surtout chez les microbes englobés, rares chez les autres.

Comment se comporte le microbe à l'intérieur du corps de la grenouille ? Y reste-t-il longtemps en vie ? Y conserve-t-il sa virulence ? Presque tous les auteurs, qui se sont occupés de l'action réciproque de la grenouille et du *Bacillus anthracis*, ont abordé cette question, mais les réponses ont été diverses.

MM. Metchnikoff (38), Lubarsh (30), dans un premier mémoire ; Petruschky (51), Vowinkel (60), Fischel (12), Klein (26), Kanthack (22) croient à une atténuation rapide, qui apparaîtrait du troisième au cinquième jour.

M. Kanthack, même, prétend que, dans la majorité des cas, l'atténuation commence dans les 5 premières heures, c'est-à-dire

avant la phagocytose, si on emploie des cultures sans spores.

M. Fischel trouve que, non seulement les souris ne meurent pas, mais encore qu'elles acquièrent l'immunité pour le premier vaccin charbonneux,

M. Lubarsh, dans ses derniers mémoires, déclare qu'il y a quelquefois atténuation, mais, qu'en tout cas, elle est toujours passagère : des cultures de lymphé sur gélose tuent dans le temps normal.

M. Trapeznikoff (39) obtient également des cultures sur gélose, virulentes, même cent jours après l'inoculation ; mais il opère seulement avec des spores, forme très résistante.

M. Nuttall (48) trouve que, même dix-sept jours après l'injection de charbon, la lymphé n'a pas encore perdu sa virulence. Il a eu le tort d'employer la souris comme animal de contrôle ; cet animal est en effet sensible même à du charbon très peu virulent, comme le premier vaccin charbonneux.

Dans toutes mes expériences, j'ai inoculé de la lymphé prise au point d'inoculation, pour éviter cette objection que la bactériidie avait pu reprendre sa virulence primitive en passant de la lymphé de grenouille à 15-20° sur de la gélose à 35°.

J'ai expérimenté sur 6 grenouilles. Le bacille charbonneux qui a servi à les inoculer, en culture sur gélose, tue 2 cobayes, respectivement de 500 et 448 grammes, en 34 et 54 heures 1/2.

NUMÉROS DES GRENOUILLES	TEMPS ÉCOULÉ entre l'inoculation et la prise de lymphé.	POIDS DU COBAYE injecté.	TEMPS MIS PAR LE COBAYE à mourir.
1	8 heures.	500 grammes.	67 h. 1/2
2	2 jours + 9 heures.	442 —	44
3	5 jours + 7 heures.	560 —	65
4	6 jours + 8 heures.	620 —	62
5	8 jours.	392 —	survit ¹ .
6	11 jours + 5 heures.	537 —	44 h. 1/2.

Ces expériences montrent que, même 11 jours après l'inoculation, le bacille charbonneux de la lymphé est aussi virulent que celui conservé sur gélose.

Il n'y a donc pas atténuation notable de la bactériidie dans le corps de la grenouille. Ce résultat est très net, quoique opposé

1. Je n'ai pu expliquer cette survie : le reste de la goutte de lymphé ensemené ayant donné une belle culture pure de charbon.

à la plupart de ceux de nos devanciers. Comme eux d'ailleurs, j'ai constaté que pour les cultures sur gélose du charbon pris au point d'inoculation, il n'y a jamais d'atténuation à constater.

De ces expériences, on peut conclure que :

1° Les microbes sont englobés à l'état vivant par les leucocytes, puisque cet englobement est complet 48 heures après l'inoculation ;

2° Les articles charbonneux peuvent rester un grand nombre de jours vivants et virulents à l'intérieur des leucocytes.

M. Trapeznikoff (59) a d'ailleurs montré que les spores charbonneuses restaient plusieurs mois vivantes dans les globules blancs.

Étant donnée la présence des leucocytes au point d'inoculation, et aussi la température peu favorable à laquelle j'opérais, il n'y avait pas croissance notable de la bactériodie dans le sac dorsal. On peut d'ailleurs se demander si la lymphe constitue un bon milieu de culture pour la bactériodie.

Cette question comporte deux faces : chez l'animal vivant et en gouttes pendantes.

Il est bien connu et nous constaterons bientôt que la bactériodie pousse bien dans la grenouille à 35°.

L'étude de la culture du charbon dans la lymphe *in vitro* a été introduite dans la science par M. Nuttall (48), au moment où la théorie bactéricide des humeurs était en honneur. Il ensemait des gouttes pendantes de lymphe de grenouille avec du bacille charbonneux. Pendant les premières heures, beaucoup de bactériodies périssent et cela tient évidemment à leur transplantation sur un nouveau milieu. Il y en a d'ailleurs toujours un certain nombre qui résistent, et le lendemain on a de belles colonies ; j'ai répété ces expériences en me préoccupant principalement de la solution de cette question : *la lymphe in vitro a-t-elle des propriétés atténuantes ?*

J'ai fait deux séries d'expériences, l'une avec le charbon à spores (culture de 1 jour sur gélose), l'autre avec l'asporogène¹.

1^{re} SÉRIE. — La moitié des gouttes est placée à l'étuve, et l'autre moitié laissée dans le laboratoire où la température est de 16-18° et monte parfois jusqu'à 21°. — Les gouttes de l'étuve

1. Ces gouttes pendantes étaient prélevées dans l'exsudat dorsal 4 à 7 heures après l'inoculation.

donnent le lendemain matin un développement très net de charbon bactérien; le 2^e ou le 3^e jour, on a des spores. — Les gouttes du laboratoire poussent aussi, mais moins vite, à 24°; mais le développement s'arrête quand la température revient à 16°.

Les résultats de l'inoculation aux cobayes sont les suivants :

GRENOUILLE I. — Lymphé prise 4 h. 1/2 après l'inoculation.

AGE DE LA GOUTTE	POIDS DU COBAYE	TEMPS DE LA MORT
1 jour + 2 heures à l'étuve.	326 grammes.	36 heures.
3 jours + 2 heures à l'étuve.	345 —	37 —
— dans le laboratoire.	449 —	56 —
5 jours — 2 heures à l'étuve.	650 —	85 —
7 jours + 2 heures laboratoire.	407 —	33 —
9 jours — 4 heures étuve.	425 —	47 —
— laboratoire.	619 —	40 —
13 jours + 3 heures laboratoire.	450 —	38 —

GRENOUILLE II. — Lymphé prise 6 heures après l'inoculation.

AGE DE LA GOUTTE	POIDS DU COBAYE	TEMPS DE LA MORT
0 heure.	772 grammes.	46 heures.
4 jour étuve.	577 —	56 —
5 jours — 4 heures laboratoire.	602 —	67 —
7 jours étuve.	317 —	56 —
14 jours — 6 heures laboratoire.	613 —	survit ¹
id. id.	465 —	survit.

La bactérie qui a servi à ces deux séries d'expériences tuait en une quarantaine d'heures un cobaye de 500 grammes.

2^e SÉRIE. — CHARBON ASPOROGÈNE

GRENOUILLE I. — Lymphé prise 5 heures 1/2 après l'inoculation.

AGE DE LA GOUTTE	POIDS DU COBAYE	TEMPS DE LA MORT
2 jours — 3 heures. Etuve.	587 grammes.	45 heures.
— — laboratoire.	639 —	42 —
4 jours — 6 heures étuve.	670 —	52 h. 1/2.
— — étuve.	610 —	survit (impurétés.)
6 jours — 3 heures laboratoire.	665 —	98 —
6 jours — 6 heures étuve.	508 —	survit.
9 jours — 7 heures laboratoire.	537 —	48 —

1. Pour la 1^{re} survie, le charbon inoculé était accompagné d'un autre microbe; dans le 2^e cas, le charbon était pur.

GRENOUILLE II. — *Lymph*e prise 6 heures 1/2 après.

AGE DE LA GOUTTE	POIDS DU COBAYE	TEMPS DE LA MORT
1 jour 6 heures étuve.	590 grammes.	53 heures.
3 jours 2 heures étuve.	477 —	67 h. 1/2.
Témoins.	605 —	52 —
—	665 —	98 —

Ces deux séries d'expériences concluent très nettement à une non atténuation.

La lymph*e in toto* constitue donc un bon milieu de culture pour la bactéri*di*e charbonneuse. — L'étude de cette lymph*e* nous donne une autre démonstration de ce fait que j'ai déduit de mes recherches sur la durée de vie du bacille dans le corps de la grenouille, à savoir que les microbes sont englobés à l'état vivant : en observant une goutte à l'étuve, on constate que de petites colonies prennent naissance dans les leucocytes, et proviennent naturellement des microbes qui y sont inclus. Les leucocytes constituent eux aussi un milieu favorable, mais seulement quand ils sont morts.

Il suffit de comparer ce que j'ai dit à propos des poissons avec ce que nous venons de voir pour se convaincre de la similitude absolue des phénomènes observés dans le mode de réaction de ces animaux contre le charbon. Et cette similitude doit suffire, à mon avis, pour prouver que la théorie de MM. Kanthack et Hardy (23-24), non applicable aux poissons, ne doit pas l'être non plus aux grenouilles.

La constatation que les microbes sont englobés à l'état vivant et virulent par les leucocytes nous empêche également d'accepter cette théorie.

Examinons pour terminer ce qu'il faut penser de la présence des éosinophiles au point d'inoculation.

Quelles sont les cellules qu'on rencontre dans l'exsudat péritonéal?

Normalement, le sac lymphatique dorsal renferme une petite quantité de lymph*e*. Si on cherche, à l'aide d'une pipette effilée, à recueillir un peu de cette lymph*e*, on n'en a jamais qu'une quantité insignifiante. Il faut recourir aux artifices que M. Ranvier décrit dans son traité d'histologie, pour s'en procurer une quantité appréciable.

Dans cette lymphe se trouvent les 3 sortes de cellules qui constituent les globules blancs des grenouilles.

1° Les lymphocytes, petites cellules à noyau unique, arrondi, prenant assez uniformément et assez fortement les couleurs basiques d'aniline, ce noyau occupe presque toute la cellule; le protoplasme tient une place extrêmement faible, et il prend le bleu de méthylène plus fortement que le noyau;

2° Les leucocytes ordinaires à noyau tantôt arrondi et unique (c'est le cas le plus rare), tantôt multilobé; tous les termes de passage sont à observer entre ces deux formes extrêmes; on peut avoir jusqu'à 4 lobes. Ces lobes sont en général nettement séparés et unis entre eux par des ponts de substance d'une finesse et d'une ténuité extrêmes (fig. 8); on observe ces fils d'union comme une légère ligne bleue, un peu plus épaisse au voisinage des lobes. Dans des cas assez rares, on n'observe pas ces fils d'union; mais il semble impossible de dire qu'ils n'existent pas. Ce noyau, si varié d'aspect, se colore bien par le bleu de méthylène, aussi fortement que le noyau des lymphocytes.

Il n'existe donc pas dans la lymphe de la grenouille deux types tranchés de globules blancs tels que les microphages et les macrophages humains.

Les microphages existent seuls; mais ils ne présentent pas toujours le type polynucléaire.

Le protoplasme occupe un volume double du noyau et se colore en bleu très clair, à peine granulé. Ce sont les leucocytes hyalins de MM. Kanthack et Hardy;

3° Les éosinophiles, comme dimensions et comme forme du noyau, rappellent tout à fait les leucocytes hyalins. Notons cependant que le noyau ne prend pas toujours la couleur aussi fortement que celui de ces derniers. On a tous les degrés jusqu'au bleu très pâle. Tout l'espace extra-nucléaire est rempli de granulations arrondies se colorant en rouge par l'éosine, en jaune sale par l'aurantia, et ayant tous les caractères des granulations α d'Ehrlich (fig. 9).

Quel rôle jouent ces diverses formes de leucocytes dans la leucocytose et la phagocytose?

Dans la lymphe normale, dans le sang, les lymphocytes sont en proportion assez forte, quelquefois la moitié du nombre total des globules blancs.

Dans l'exsudat dorsal, on en trouve à peine 2 0/0, quelquefois moins; et jamais on ne trouve de microbes dans ces cellules. Leur chimiotaxie est nulle ainsi que leur pouvoir phagocytaire. Les vrais phagocytes, ce sont les leucocytes ordinaires, les leucocytes à protoplasme hyalin. Ils arrivent des premiers; *dès le commencement de la leucocytose*, nous en voyons avec des microbes à leur intérieur; et leur rôle continue jusqu'à la disparition complète de tous les microbes.

Les uns en contiennent peu à leur intérieur, les autres en sont bourrés; le noyau paraît alors refoulé à une extrémité de la cellule qui renferme une grande vacuole avec les microbes à son intérieur. Souvent les microbes isolés, englobés par les leucocytes, sont entourés d'un espace clair; ce qui indique nettement qu'ils sont dans des vacuoles. C'est probablement là le stade initial de l'englobement.

J'ai été maintes fois frappé par ce fait que, dans une cellule, les microbes englobés sont en majeure partie disposés parallèlement les uns aux autres.

Chaque leucocyte agit pour son propre compte, et jamais nous n'avons observé de ces plasmodes que décrivent MM. Kanthack et Hardy. Tout au plus voit-on, assez rarement, plusieurs leucocytes bout à bout occupés à dévorer une longue chaîne bactérienne. Nous sommes sur ce point d'accord avec tant d'auteurs qu'il est superflu d'insister. Les éosinophiles viennent au point d'inoculation et souvent même en grand nombre. D'autres fois, on n'en trouve que 1 0/0, surtout si l'on opère avec *Rana esculenta*.

L'opinion unanime, dans la science, est que les cellules à granulations n'ont aucun pouvoir phagocytaire. Et MM. Kanthack et Hardy, qui ont porté leur attention sur cette variété de cellules, qui ont cherché, par de nombreuses expériences, à préciser leur rôle, sont tout à fait affirmatifs sur ce point. Ils disent bien avoir souvent vu des microbes collés pour ainsi dire sur ces cellules, mais jamais ils n'en ont observé à leur intérieur.

Il est difficile souvent de dire si un microbe est à l'intérieur d'une cellule ou à sa surface: maintes fois on hésite. Mais certains cas ne pouvaient être douteux, et j'ai dû me rendre à cette évidence que les *éosinophiles sont des phagocytes*; ils englobent des microbes. C'est là un fait qui est surtout impor-

tant au point du vue de la physiologie générale du sang et de la lymphe.

Dans le cas de la grenouille, leur rôle phagocytaire se réduit à peu de chose. Ceux qui contiennent des microbes à leur intérieur sont rares, et ces microbes sont en général en très petit nombre, 2 ou 3, 5 au plus.

Les faits que je viens d'indiquer seront repris dans notre chapitre final quand nous chercherons à nous faire une idée du rôle de la cellule éosinophile.

B. *Septicémie des souris*. — Dans son mémoire de 1889, M. Lubarsh (32) s'exprime ainsi : « C'est un fait particulièrement remarquable que les bacilles de la septicémie des souris qui se trouvent en si grande quantité dans les leucocytes des souris sensibles à la maladie, ne donnent lieu, dans le sac lymphatique dorsal de la grenouille, à des phénomènes de phagocytose, que si on en injecte une quantité considérable ; dans mes recherches, il fallait au moins 5 à 6 c. c. d'un liquide contenant beaucoup de microbes en suspension. »

Ainsi donc les leucocytes de la grenouille n'engloberaient que dans des cas tout à fait exceptionnels le *Bacillus murisepticus*. Et de ce fait, M. Lubarsh (35), dans son grand travail d'ensemble sur le charbon, tire un très bon argument contre la théorie des phagocytes.

Dans son dernier mémoire (36), après avoir développé cette idée que les leucocytes sont attirés par les produits de sécrétion des microbes, il ajoute : « Si les bacilles virulents sont portés dans un milieu nutritif tellement défavorable que leurs propriétés vitales les plus faibles ne puissent plus se manifester (B. de la septicémie des souris chez la grenouille, bactériidie charbonneuse chez les Ascidies), il ne se produit ni chimiotaxie ni phagocytose.... » C'est d'ailleurs une simple hypothèse que M. Lubarsh n'appuie par aucun fait. Il m'a paru intéressant de rechercher s'il y avait réellement là une exception à la théorie de la phagocytose.

Je me suis servi de septicémie des souris tuant la souris en 2 jours 1/2 à 3 jours à une dose variant entre 1/4 et 1 c. c. Entre ces limites, la quantité de culture injectée n'a pas d'influence sur la durée de l'infection.

La culture était faite en bouillon de veau peptonisé, et on

injectait dans le sac dorsal 1 c. c. de cette culture âgée de 1 jour ou 2 au plus.

Une petite quantité de lymphé était prélevée au point d'inoculation à des temps variables après l'injection.

L'examen des lames colorées permet de se rendre compte de la manière dont la grenouille réagit.

Une heure après l'inoculation, pas ou extrêmement peu de leucocytes dans le sac dorsal (probablement ceux qui y étaient déjà) : donc leucocytose nulle. 1 heure 1/2 ou 2 heures après, on observe toujours une phagocytose, tantôt très faible, tantôt très active (avec des phagocytes bourrés de microbes).

Deux à trois heures après, les microbes libres commencent à être moins nombreux. La phagocytose est de plus en plus importante. Quelquefois même, la moitié des microbes sont déjà intracellulaires, certains phagocytes sont tellement bourrés de microbes qu'ils ont triplé ou quadruplé de volume (fig. 12).

Le résultat observé 4 heures après ne diffère pas sensiblement de celui que je viens de décrire. On passe par un maximum d'action qui dure toute la quatrième heure. A ce moment, le sac dorsal est gonflé de lymphé, tout à fait comme dans le cas du charbon.

Puis cet exsudat diminue sensiblement. Après 5 heures, le nombre des microbes libres diminue rapidement; le nombre des phagocytes également; les leucocytes bourrés de microbes deviennent plus rares.

Si nous examinons la lymphé 17 heures après l'inoculation, nous observons très peu de microbes libres; et en revanche des phagocytoses nombreuses : la mauvaise coloration des microbes semble indiquer que beaucoup d'entre eux ne sont plus vivants. — Les phénomènes de dégénérescence sont des plus nets; les microbes se colorent faiblement en bleu, quelques points seulement prenant bien la couleur.

On observe quelquefois aussi dans les cellules de petites boules bleu foncé, qui proviennent indubitablement des microbes. M. Metchnikoff en a figuré de semblables pour le rouget (41).

29 heures après l'inoculation, la phagocytose est à peu près terminée. — Les microbes intracellulaires se colorant bien sont extrêmement rares. Les formes d'involution représentées (fig. 15 et 16), ne sont plus fréquentes. Dans beaucoup de cellules, on

observe de petites masses tout à fait informes se colorant assez faiblement, mais mieux que le fond protoplasmique homogène. Quelquefois la masse rappelle un peu une forme de bâtonnet. Ce sont les derniers restes des microbes tués et bientôt digérés.

Ainsi donc, la disparition des bacilles de la septicémie se fait peu à peu et dans les mêmes conditions que pour ceux du charbon. Il semble seulement que la leucocytose, et aussi la phagocytose commencent un peu plus tôt.

Nous sommes loin de cette idée de M. Lubarsh, que les cultures de septicémie ont un pouvoir chimiotactique à peu près nul : il est supérieur à celui du charbon.

Nous devons maintenant résoudre les questions, jusqu'ici inabordées, de la vie et de la virulence du microbe sous la peau de la grenouille.

J'ai fait trois sortes d'expériences :

1° De la lymphe prise un temps variable après l'inoculation estensemencée dans du bouillon ; et, quand il y a culture pure de septicémie, le bouillon est injecté à une souris ;

2° De la lymphe prise au point d'inoculation est introduite sous la peau du dos d'une souris ;

3° De la lymphe est conservée à l'étuve ou dans le laboratoire un temps variable et étudiée au bout de ce temps (colorations, cultures en bouillon, inoculations).

Les deux premières séries d'expériences, traitant de l'action de la lymphe chez l'animal vivant, nous les examinerons ensemble.

Elles se trouvent résumées dans le tableau suivant :

DATE DE LA PRISE DE LYMPHE après l'inoculation de la grenouille.	RÉSULTAT DE L'INOCULATION de la lymphe. Souris meurt en :	ENSEMENCEMENT EN bouillon.	RÉSULTAT DE L'INOCULATION de f. c. c. en bouillon. Souris meurt en :
27 heures.	»	Culture pure.	2 j. et quelques heures.
27 —	»	id.	Moins de 2 j.
20 —	4 j. $\frac{1}{4}$	»	»
24 —	»	Culture pure.	2 j. et $\frac{1}{2}$
27 —	»	id.	3 j. et quelques heures.
4 jours.	»	id.	2 j. et quelques heures.
id.	»	id.	3 j. et quelques heures.
id.	Ne meurt pas.	1 tube sur 2 pousse	4 j. et quelques heures ¹
6 jours.	id.	id.	»
8 —	id.	id.	»
id.	5 j. $\frac{1}{2}$	Culture pure.	»
id.	5 j. $\frac{1}{2}$	id.	»
id.	6 j. $\frac{1}{4}$	id.	»
9 —	Ne meurt pas.	Nul.	»
11 —	5 j. moins 3 ^h .	Culture pure.	2 j. 3 4
12 —	Ne meurt pas.	Nul.	»

Un certain nombre de faits ressortent de ce tableau. Le bacille de la septicémie reste vivant longtemps dans le sac lymphatique dorsal; j'ai encore eu une culture en ensemençant la lymphe 11 jours après l'inoculation.

Ces cultures en bouillon tuent la souris dans le temps normal. Donc, s'il y a atténuation, elle est tout à fait passagère, et disparaît dès qu'on transporte le bacille dans un bon milieu de culture.

En examinant le résultat des inoculations de lymphe directement à des souris, il semble qu'il y ait tantôt atténuation, tantôt perte complète de la virulence.

Mais toutes les fois que la souris n'est pas morte, nous devons remarquer que les cultures faites avec de la lymphe prise en même temps que celle qui a servi à l'inoculation, ou bien n'ont rien donné, ou bien ont donné seulement une culture sur 2 tubes ensemencés. — Il serait donc exagéré de chercher à tirer une conclusion de ces survies.

Restent les cas où les souris sont mortes, mais avec un retard sur le temps normal. En admettant que les bacilles qui ont tué les souris étaient atténués, ils ont vite repris leur virulence : une culture en bouillon du sang de ces souris tue dans le temps

1. Dans ce dernier cas, nous avons inoculé une culture à une souris de poids double de la moyenne.

normal. — Mais je crois bien plutôt que le retard dans la mort est dû au petit nombre de bactéries injectées.

J'ai, en effet, inoculé plusieurs souris avec une aiguille à cataracte trempée dans une culture de septicémie, et il est évident que j'inoculais ainsi un nombre de microbes incomparablement plus grand que celui qui se trouve dans une goutte de lymphé plus de 4 jours après l'injection.

Mes résultats ont été les suivants :

AIGUILLE A CATARACTE PLONGÉE DANS	SOURIS MEURT EN
Culture de 1 jour.	2 jours $1/2$
—	id.
Culture de 2 jours.	8 jours.
—	3 jours $1/4$
—	5 jours $1/4$
Culture de 7 jours.	4 jours $1/4$
—	4 jours $1/2$
—	4 jours $1/2$

La moyenne est de 4 jours $1/2$, et ce nombre se rapproche de ceux de la seconde colonne du tableau.

Remarquons même que la lymphé retirée 20 heures après l'inoculation tue en 4 jours $1/4$; elle agit donc exactement comme la culture introduite par l'aiguille à cataracte.

Je crois donc pouvoir conclure que le bacille de la septicémie se conserve au moins 8 jours dans le sac lymphatique dorsal, sans perdre sa virulence.

Si nous rapprochons cette conclusion de celle déjà formulée sur l'englobement des bacilles, nous voyons que les microbes sont englobés à l'état vivant et virulent, et qu'ils peuvent rester plusieurs jours vivants à l'intérieur des leucocytes.

L'examen de la lymphé *in vitro* va nous fournir une autre démonstration de ce fait.

Le bacille de la septicémie pousse bien dans cette lymphé à 35°. Mais la culture est très discrète, et on ne la met bien en évidence qu'en desséchant la goutte, la fixant et la colorant par le Gram. Si on plonge la préparation auparavant dans l'éosine, on note les faits suivants :

Sur une goutte conservée 2 jours, les phagocytes se colorent

mal; seuls, les grains éosinophiles prennent bien la couleur. C'est là un fait tout à fait constant; les granulations éosinophiles, en dehors de l'organisme, se conservent longtemps inaltérées. M. Cuénot (8) dit avoir observé le même fait pour les éosinophiles d'écrevisse.

Les phagocytes renfermant les microbes ne sont pas gonflés, mais les microbes ont déjà bien poussé; les articles sont isolés les uns des autres, et la colonie épouse la forme du leucocyte. Les microbes ont donc bien été englobés vivants.

Dans la préparation que je décris plus spécialement, la prise de lymphé avait été faite 20 heures après l'inoculation. Les microbes libres étaient donc très rares; ils avaient poussé aussi; mais n'étant pas gênés par le contenu solide du leucocyte, ils avaient donné des arbuscules allongés.

Tous les microbes prennent énergiquement la couleur, ce qui indique encore que le milieu de culture est favorable. A-t-il des propriétés atténuantes?

Lymphé prise 3 heures après l'inoculation.

Goutte conservée 1 jour à l'étuve	tue souris en 4 jours 3/4.
—	ne tue pas.
— 2 jours	—
—	tue 6 jours.
— 5 jours laboratoire	tue 4 jours 1/4.

Lymphé prise 4 heures après l'inoculation.

Goutte conservée 2 jours à l'étuve	ne tue pas souris.
— id.	id.
— 4 jours	tue souris en 3 jours 1/2
— 6 jours	4 jours 1/4
— 8 jours	3 jours 1/2
— id.	2 jours 3/4

Lymphé prise 19-20 heures après l'inoculation.

Goutte inoculée immédiatement	tue souris en 4 jours 1/4.
Goutte conservée 2 jours 1/4 à l'étuve.	11 jours.
—	ne tue pas.
— 5 jours	tue en 4 jours 3/4,

Enfin une goutte de lymphé prise 30 heures après l'inoculation, et conservée 7 jours à l'étuve, a tué la souris en 5 jours 1/4.

Je crois encore devoir conclure de ces expériences que la lymphe *in vitro* n'a pas de propriétés atténuantes.

Notons en effet que les insuccès portent surtout sur les inoculations de lymphe gardée peu de temps à l'étuve. Quand la lymphe datait de plus de 5 jours, les souris mouraient tousjours, et certaines même en 3 jours.

En résumé la grenouille se comporte vis-à-vis de la septicémie des souris exactement de la même manière que vis-à-vis du charbon. La prétendue exception de M. Lubarsh à la théorie des phagocytes est donc un argument de plus, et un argument des plus nets, à ajouter à la liste nombreuse de ceux déjà invoqués en faveur de cette théorie.

Pour décrire les différents leucocytes qui viennent au point d'inoculation, pour parler du rôle phagocytaire de chacun d'eux, il faudrait répéter ce que j'ai dit dans le cas du charbon. Rarement j'ai vu des bacilles dans les éosinophiles ; et j'ai confirmé ce fait par l'examen des colonies poussées en goutte pendante ; elle n'ont presque jamais pour centre un éosinophile.

Comme pour le charbon, les quelques éosinophiles renfermant peu de granulations paraissent avoir des propriétés phagocytaires plus marquées. La fig. 14 représente un de ces leucocytes avec quelques bacilles de la septicémie.

Comme le charbon, la septicémie ne reste pas localisée au point d'inoculation ; on la trouve dans le sang et les différents organes. 24 heures après une inoculation, une goutte de sang du cœur donne une culture, mais elle met au moins 48 heures à être apparente.

J'ai noté qu'une portion de foie de grenouille prise 4 jours après l'inoculation avait tué une souris en 4 jours $1/2$ (encore un nombre semblable à ceux donnés précédemment.)

V. — GRENOUILLE ET CHARBON A 35°

M. Gibier (15), le premier, constata le fait qu'un certain nombre de grenouilles inoculées du charbon et placées dans de l'eau à 35-37° mouraient avec de nombreux bacilles dans le sang et les organes. M. Metchnikoff (38) vérifia ce fait en 1884 et l'expliqua en admettant qu'à 38° le charbon sécrète un poison qui paralyse l'action des leucocytes.

Depuis, beaucoup de savants ont repris cette question. Les uns pensent que le corps des grenouilles chauffées, présente moins de résistance à la croissance du bacille; les autres, comme M. Petruschky (51), que l'énergie des bacilles a augmenté; M. Voswinkel (60) croit même que les deux facteurs entrent en jeu. Pour MM. Nuttall (48) et Lubarsh (35), le corps des grenouilles chauffées se comporte exactement comme celui de grenouilles mortes.

MM. Lubarsh (35) et Sanarelli (57) mettent bien en évidence ce fait que, à des températures élevées, les grenouilles inoculées et non se comportent de la même façon. — M. Lubarsh constate que, à 35-37°, toutes meurent en 8 à 16 heures; à 28-31°, il y en a qui survivent. Et il arrive à cette conclusion qu'en réalité les grenouilles chauffées ne meurent pas du charbon.

Tous les savants se bornent à peu près uniquement à observer le résultat final. Ils n'entrent pas dans l'étude intime des phénomènes, qui consiste à chercher comment se comporte le bacille du charbon dans le corps de la grenouille depuis le moment de l'inoculation jusqu'à la mort, et surtout, quelques heures avant la mort. Presque tous se contentent de déclarer que la phagocytose au point d'inoculation est plus faible que chez les grenouilles à 20°

M. Kanthack (22), dans des expériences assez compliquées, porte alternativement les grenouilles à 25° et à 12°. Il déclare que le charbon pousse à 25° et que les phagocytes n'y touchent pas (les éosinophiles ne sont pas alors attirés); il y a ensuite destruction du charbon à 12°, grâce au concours des éosinophiles.

Je me suis attaché à suivre le phénomène depuis le commencement jusqu'à la fin.

Les grenouilles étaient portées à la chambre étuve à 35°, dans un cristallisoir contenant une petite quantité d'eau, et légèrement incliné, afin que l'eau occupe seulement la moitié du fond. Ce cristallisoir était fermé par un treillis en toile métallique. L'eau était renouvelée une ou deux fois par jour.

Le point important est de mettre une quantité convenable d'eau. S'il y en a trop peu, le cristallisoir se dessèche pendant la nuit, et le lendemain matin on risque de trouver les grenouilles mortes desséchées. S'il y en a trop, l'inconvénient est autre : le corps de la grenouille porte une riche flore microbienne

qui se développe rapidement dans l'eau à 35° et la corrompt ; les grenouilles meurent alors empoisonnées ou asphyxiées.

En y prenant soin, j'ai réussi à faire vivre certaines grenouilles à l'étuve. Et elles continuaient à vivre ensuite à 20° — Naturellement, à côté des grenouilles inoculées, je mettais en même temps, et dans des conditions analogues, des grenouilles témoins appartenant au même lot que les premières.

En opérant comme je viens de le dire, un premier fait m'a frappé : c'est la différence de sensibilité pour la chaleur des *Rana esculenta* et des *Rana temporaria*.

Les *Rana esculenta*, inoculées ou non, résistent très bien à l'action de la chaleur ; j'en ai eu qui ont vécu des semaines à 33°. Pour cette espèce, l'immunité à 33° pour le charbon ne fait pas de doute ¹.

La *Rana temporaria*, placée dans les mêmes conditions que la première, résiste moins bien ; elle meurt toujours entre 12 heures et 4 jours, la température du laboratoire étant 20°. Malgré les précautions prises, je n'ai pu en garder plus de 5 jours.

Par une acclimatation lente et graduée, on arrive à faire vivre des *Rana temporaria* à 35°.

Dans toutes ces expériences, les grenouilles étaient portées brusquement de 20° à 35°. Elles étaient inoculées au moment d'être mises à l'étuve.

J'ai reconnu, comme M. Lubarsh, que les grenouilles inoculées et non inoculées mouraient exactement de la même façon. Il est donc évident que les grenouilles inoculées ne meurent pas du charbon.

Que devient le charbon à l'intérieur du corps d'une grenouille à 35° ? Mes recherches ont porté sur 3 points :

A. — Examen de l'exsudat dorsal à des temps variables après l'inoculation ;

B. — Examen des différents organes d'une grenouille tuée au moment où elle n'a plus qu'un petit nombre d'heures à vivre

C. — Examen du sang et des différents organes d'une grenouille morte à l'étuve.

1. L'étuve étant par hasard à 38°, une *R. esculenta* y a vécu 5 jours et est morte accidentellement ; 6 heures après l'inoculation, la moitié des bacilles étaient intracellulaires.

2. Quand la température du laboratoire est 42-45°, les grenouilles meurent à l'étuve en moins de 12 heures.

A. — D'une façon générale, on peut dire qu'il y a leucocytose aussi rapide que chez les grenouilles à 15-20°, mais moins intense. La phagocytose est des plus nettes.

Sur ce point je suis en contradiction avec presque tous mes devanciers. Aussi vais-je préciser le fait par la description de quelques lames colorées.

1° RANA ESCULENTA. — *Lymphé prise 4 heures après l'inoculation.* Leucocytose moyenne; la grande majorité des bacilles est intracellulaire.

Lymphé prise 6 heures après (autre grenouille); bonne leucocytose, phagocytose très intense et tout aussi nette qu'à 15-20°. Les microbes libres sont rares.

Lymphé prise 8 heures après (autre grenouille). — (Le maximum de leucocytose est dépassé.) Leucocytose faible; la moitié des leucocytes contiennent des bactéries dont quelques-unes se colorent mal; la majeure partie des bacilles sont libres.

Lymphé de la même grenouille 24 heures après. Même leucocytose que la veille; les bacilles libres sont rares. On voit beaucoup de leucocytes ayant englobé des microbes; mais dans la minorité des cas seulement, ces microbes sont bien colorés.

Lymphé de la même grenouille 53 heures après. Les microbes semblent avoir complètement disparu; on n'en voit plus de libres; dans quelques leucocytes, traces plus ou moins nettes.

2° RANA TEMPORARIA. — *Lymphé prise 4 heures après.* Leucocytose faible, 1/3 de leucocytes avec microbes; la moitié des microbes intracellulaires (cette grenouille meurt la nuit suivante avec charbon généralisé).

Lymphé prise 5 heures après. Leucocytose faible. Une notable partie des leucocytes (1/3 ou 1/4) ont englobé des microbes; quelques-uns en sont bourrés. Néanmoins les microbes libres sont plus nombreux que les intracellulaires.

Lymphé de la même prise 7 heures 1/2 après. Faible leucocytose. La majeure partie des leucocytes renferment des microbes; quelques-uns en assez grand nombre. La moitié au moins des microbes sont intracellulaires. Beaucoup d'éosinophiles.

Lymphé de la même prise 24 heures après. Même leucocytose que la veille. Très peu de microbes libres. Les englobés sont assez nombreux et paraissent encore peu dégénérés; — 1/8 d'éosinophiles. (Cette grenouille meurt la nuit suivante avec charbon généralisé).

Lymphé prise 55 heures après. Il existe encore une leucocytose. La moitié au moins des globules renferment des microbes, en général en très grand nombre, et paraissant en bon état; les bacilles dégénérés sont peu communs. Les bacilles libres sont tellement rares qu'ils peuvent provenir de leucocytes éclatés. Cette grenouille meurt accidentellement (par dessiccation du cristalliseur) 4 jours 1/2 après l'inoculation; aucune trace de charbon dans le et les organes.

De tout ce qui précède résulte, il me semble, que la destruction du charbon, au point d'inoculation, marche parallèlement chez les grenouilles à 35° et chez les grenouilles à la température ordinaire. Il y a simplement un léger retard pour les premières.

Le même parallélisme existe pour la destruction dans le sang et le foie. 2 *Rana esculenta* traitées de la même façon, l'une à 35°, l'autre à 20°, sont sacrifiées 33 heures après l'inoculation.

POUR LA GRENOUILLE A 20°		POUR LA GRENOUILLE A 35°	
4 gouttes de sang donnent 6 colonies.	—	5 gouttes de sang donnent 15 colonies.	—
Le frottis d'un lobe de foie 10.	—	4 goutte — 5 —	—
		Frottis de foie 15	—

Les nombres sont bien comparables.

B. — Avec un peu d'habitude, il est facile de diagnostiquer, quelques heures à l'avance, la mort des grenouilles. Je vais décrire brièvement ce que j'ai observé chez 2 grenouilles (*R. temporaria*) sacrifiées l'une 12 heures, l'autre 45 heures après l'inoculation.

La 1^{re} appartenait à un lot de 3 grenouilles. Au moment où on la sacrifie, ses 2 compagnes sont mortes; elle paraît très affaiblie; mise sur le dos elle ne se relève pas.

Le sang observé sans coloration ne montre pas de bactériidies. Mais en ensemencant 2 gouttes de sang sur gélose, il pousse de nombreuses colonies. Au point d'inoculation, exsudat faible. L'examen de la lymphe dorsale, en lame colorée, montre des microbes libres, mais la majorité des microbes sont à l'intérieur des leucocytes. Donc phagocytose très nette et très avancée.

Les coupes du foie, colorées comme nous l'avons indiqué précédemment, montrent :

Dans les vaisseaux, hyperleucocytose très nette. Nombreux microbes dans tout l'organe; la grande majorité sont intracellulaires.

Parmi les phagocytes, la plus forte partie sont des leucocytes, et se trouvent soit dans les grands, soit dans les petits vaisseaux. Ces leucocytes se distinguent nettement des cellules hépatiques proprement dites par leurs noyaux plus petits, à chromatine disposée d'une façon plus dense et plus homogène.

Les cellules endothéliales rappellent, par leurs noyaux, les eucocytes; quelques-unes manifestent leurs propriétés phago-

cytaires. Leur position et la présence fréquente des grains de pigment brun à leur intérieur permettent de les reconnaître facilement. Ces cellules du foie des grenouilles, appelées souvent « *pigmentzellen* » sont bien connues : ce sont les homologues des cellules étoilées de Kupfer du foie des mammifères ; comme elles ce sont des *macrophages*.

Les microbes libres sont peu nombreux, toujours en filaments d'un très petit nombre d'articles ; on n'observe pas encore de développement net.

Dans la rate, le nombre des microbes est proportionnellement moins grand que dans le foie. La majorité de ces microbes sont englobés ; il y en a aussi de libres, et certains ont même légèrement poussé (4 ou 5 articles au maximum).

Dans le rein, le phénomène est un peu différent. Là les microbes libres sont nombreux et il y en a dans la veine cave, dans la veine porte rénale, et dans les ramifications de ces veines. Sur aucune des coupes, je n'en ai observé dans l'aorte, à la hauteur du rein.

Les microbes sont rares dans les glomérules. Ces bacilles paraissent avoir déjà poussé ; et l'on remarque fréquemment des filaments d'une dizaine d'articles au moins.

Quelques leucocytes renferment des microbes ; mais ces phagocytes sont bien moins nombreux que dans le foie.

Ainsi donc, cette grenouille, au moment où son agonie va commencer, montre des microbes englobés dans tous ses organes, et cet englobement semble être surtout dû aux *macrophages*.

Chez une autre grenouille, sacrifiée 45 heures après l'inoculation parce qu'elle paraissait malade (sa compagne, alors bien portante, meurt 20 heures après), l'examen des coupes d'organes ne révèle aucun bacille charbonneux. Deux gouttes de sang ensemençées sur gélose ne donnent le lendemain que 3 colonies de charbon. La destruction des microbes était donc à peu près complètement terminée au moment où cette grenouille commençait à présenter des signes morbides.

C. — Les examens *post mortem* corroborent complètement ce que nous venons d'observer peu d'heures avant la mort. Voici, avec quelques détails, le résultat de l'examen des différents organes d'une grenouille ouverte comme morte 24 heures après l'inoculation, mais dont le cœur battait encore.

Dans le *sang*, on voit de rares bacilles en filaments de quelques articles. Deux gouttesensemencées sur gélose donnent le lendemain un gazon charbonneux à peu près uniforme.

Dans le *foie*, on voit un nombre considérable de microbes. On rencontre des microbes libres surtout dans les gros vaisseaux qui sont gorgés de globules sanguins. Ces microbes sont déjà en chaînes, quelquefois d'une dizaine d'articles. Certaines coupes de vaisseaux montrent un réseau assez serré de microbes; d'autres en montrent assez peu : et alors on peut voir nettement que les leucocytes bourrés de microbes bien colorés sont nombreux.

Cette constatation est surtout facile à faire dans les petits vaisseaux et particulièrement dans les capillaires; là les microbes ont peu poussé, et on en voit des quantités d'intracellulaires. Nous n'avons jamais vu de microbes dans les cellules endothéliales des gros vaisseaux, cellules aplaties et à noyau allongé se colorant bien par le carmin. Mais dans les capillaires, les cellules endothéliales remplies de microbes ne sont pas rares, et surtout celles qui renferment du pigment; pourtant, quand le pigment remplit la cellule, on ne voit plus de microbes. Dans la destruction des bacilles, ces cellules macrophages paraissent jouer un rôle qui est environ le dixième de celui des leucocytes.

Dans la *rate*, il y a incontestablement moins de microbes que dans le foie, la plupart intracellulaires. Faible développement microbien.

Le *rein* au contraire, contient un nombre considérable de bactériidies. Ce qui frappe à un faible grossissement, c'est la teinte violet foncé d'un certain nombre de glomérules.

Les petits vaisseaux de ces glomérules sont alors gorgés de microbes en filaments assez longs, souvent incurvés pour suivre le trajet de ces vaisseaux.

La veine porte afférente est gorgée de sang; les microbes, en grande partie extra cellulaires, sont en filaments assez courts.

Les vaisseaux de la face dorsale (artérioles et ramifications de la veine porte) sont remplis d'éosinophiles et de microbes ayant déjà bien poussé. Ceux de la face ventrale renferment peu de microbes.

Malgré ce développement considérable de la bactériidie, il

est facile de voir des bacilles intracellulaires disséminés un peu partout. Il y en a quelques-uns dans des cellules endothéliales.

Ce tableau de la distribution des microbes dans les organes au moment de la mort, nous le retrouvons semblable chez tous les animaux morts avec du charbon généralisé.

Si nous faisons au contraire l'autopsie de la *Rana temporaria* morte cinquante heures après l'inoculation, nous ne trouvons aucun microbe ni dans le sang ni dans les organes. Il en est de même pour les autres grenouilles mortes au bout d'un temps plus long.

D'après tout ce qui précède, il est facile de se faire une idée de la façon dont le charbon se comporte chez une grenouille à 35°. La destruction des microbes se fait comme chez la grenouille à 15-20° : destruction au point d'inoculation par les leucocytes : transport des microbes dans le courant sanguin, arrêt dans un certain nombre d'organes, en particulier le foie, où il y a une faible destruction par les « pigmentzellen ». La disparition des microbes demande un certain temps pour être à peu près complète. C'est ce qui arrive chez les grenouilles qui résistent à la température de l'étuve, et aussi chez celles qui réussissent à y vivre un certain temps, plus de 48 heures par exemple. Il est bon de faire remarquer que toutes nos expériences ont été faites avec du charbon asporogène. En opérant avec des spores, M. Trapeznikoff (59) a eu mort avec charbon très longtemps après l'inoculation.

Chez les grenouilles qui meurent le premier ou le deuxième jour, le charbon reste encore en grande quantité dans le sang et les organes. Beaucoup de microbes se trouvent à l'état libre arrêtés par le filtre rénal. Quelques heures avant la mort, lorsque la période d'anesthésie commence, il y a probablement paralysie des leucocytes. Les microbes, étant dans un milieu nutritif favorable à leur température optima, croissent. Et au moment de la mort on a un développement considérable du charbon dans les organes.

La condition nécessaire, pour qu'une grenouille meure avec du charbon généralisé dans les organes, est donc que l'heure de la mort suive d'assez près celle de l'inoculation, pour qu'une partie notable des bacilles inoculés ne soit pas encore détruite.

Et cela est vrai, non seulement à 35°, mais aussi à des tem-

pératures plus basses. Suivant leur manière d'opérer, les auteurs ont trouvé que les grenouilles mouraient à telle ou telle température, et avec charbon généralisé ¹.

Dans une de mes expériences à 20°, une grenouille a été trouvée morte 24 heures après l'inoculation. En faisant l'étude de ses organes, j'ai retrouvé le tableau tracé pour une grenouille morte à l'étuve, avec cette différence que les microbes libres avaient bien moins poussé.

Il faut évidemment expliquer de la même façon les résultats que MM. Klein et Coxwell (25) ont obtenu en narcotisant des grenouilles à la température ordinaire avec un mélange de chloroforme et d'éther. Les grenouilles, narcotisées puis injectées avec d'assez fortes doses de matériel charbonneux virulent, meurent avec charbon généralisé en 3 jours. Là encore, il a dû y avoir paralysie des leucocytes, et le développement du charbon a pu s'opérer.

L'étude des coupes révèle ce fait que la rate paraît jouer un rôle bien moins important que le foie dans la destruction des microbes.

Il m'a paru intéressant de rechercher si la bactériémie éprouve quelques variations dans sa virulence en passant par l'organisme chauffé de la grenouille.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — (*Charbon asporogène très virulent.*) 1 goutte de sang du cœur d'une *Rana temporaria* morte en 24 heures tue un cobaye de 325 gr. en 21 heures.

5 à 6 gouttes de sang d'une *Rana temporaria* morte en moins de 24 heures, tuent un cobaye de 410 gr. en 30 heures et demi.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — (*Charbon asporogène tuant 2 cobayes de 600 gr. entre 36 et 40 heures.*) 2 cobayes sont inoculés avec le sang d'une grenouille (*R. temporaria*) sacrifiée 45 heures après l'inoculation. L'ensemencement d'une petite quantité de sang sur gélose nous permet de compter approximativement le nombre de bacilles inoculés.

Cobaye de 435 gr. reçoit 5 bacilles, meurt en 60 heures environ.

— 635 gr. — 2 ou 3 — — 68 heures et demie.

En se rapportant aux nombres donnés par M. Lubarsh (32) pour la survie des cobayes inoculés avec une bactériémie ou un nombre très faible, on constate que les chiffres ci-dessus ne témoignent d'aucune atténuation de la bactériémie.

1. M. Rohrschneider tue ses *Rana esculenta* à partir de 30° en 2 à 3 jours. D'autres tuent les grenouilles à 25° avec charbon généralisé.

Je peux donc généraliser ce que j'ai dit dans un chapitre précédent : La lymphe de grenouille n'a de propriétés atténuantes ni chez l'animal vivant, ni *in vitro*, ni à 15-20°, ni à 35°.

VI. — RÔLE DES DIFFÉRENTS ORGANES DE LA GRENOUILLE DANS LA RÉACTION CONTRE LE CHARBON INTRODUIT PAR VOIE INTRAVASCULAIRE.

La bibliographie de cette question est courte.

M. Hess (49) injecte 1 c. c. de culture, diluée dans la solution physiologique de sel marin, dans la veine crurale des grenouilles, et recherche, à des temps différents, les bacilles dans le sang et les organes. Au bout de 3 heures, il trouve peu de bacilles dans le sang, la plupart dans les leucocytes. Au bout de 6 heures, les bacilles libres sont très rares. Il y a hyperleucocytose dans le sang, et un sixième des leucocytes renferment des microbes (tantôt 1, tantôt 15 et plus). 6 ou 8 heures après l'injection, les microbes se trouvent seulement dans les capillaires du foie (dans les leucocytes et les « pigmentzellen »).

La rate, observée 16 ou 20 heures après l'inoculation, montre quantité de microbes dans les cellules de la pulpe. Dans la moelle des os, il y a peu de microbes, et ils sont presque toujours dans de grosses cellules mononucléaires.

M. Hess observait avec soin la dégénérescence des microbes, et il en concluait que les leucocytes ont un faible pouvoir bactéricide, qu'ils ont surtout pour mission de porter les bacilles au foie et à la rate où sont les phagocytes fixes qui les détruisent.

M. Lubarsh (30), en faisant des injections par la veine abdominale, confirme les résultats de M. Hess ; il note surtout ce fait que les bacilles morts sont englobés bien moins rapidement que les vivants.

Toute autre est la conclusion de M. Voswinkel (60). Il constate la disparition des bacilles du sang en 3 heures et leur disparition complète en six jours. Mêmes résultats, quand il injecte, avant le charbon, dans les veines de la grenouille, une solution salée. De ses recherches, il conclut que la phagocytose ne joue aucun rôle dans la destruction des microbes.

Je me suis surtout préoccupé de saisir les premières phases

de la destruction des microbes. Pour cela, je fixais les organes à des temps variables entre 2 minutes et 2 heures après l'injection; les premières injections ont été faites par la veine abdominale qui se rend directement au foie.

L'injection, même faite assez lentement, (3 minutes pour 1c. c.), produit un gonflement notable du foie qui cesse environ dix minutes après la fin de l'injection.

Le premier fait qui frappe dans l'examen des organes, c'est que presque tous les bacilles sont arrêtés dans le foie. Le sang est chassé par l'injection, et les microbes sont arrêtés dans les capillaires hépatiques.

Aussi, dans les 2 heures qui suivent l'injection, ne trouve-t-on que peu de bacilles dans la rate et le rein; il faut quelquefois parcourir plusieurs coupes de la rate pour rencontrer une bactériidie; et les coupes du rein en montrent une très faible quantité.

Examinons le foie. Trois minutes après l'injection, tous les petits vaisseaux sont gorgés de microbes extracellulaires. Il n'est pas rare, néanmoins, d'observer quelques microbes dans des cellules endothéliales.

Dix minutes après, le nombre des microbes n'a pas sensiblement diminué; mais il y en a un plus grand nombre dans les cellules endothéliales.

Une demi-heure après, l'axe des vaisseaux est encore rempli de microbes; leur nombre a néanmoins diminué. De plus, on observe une leucocytose abondante; les microbes sont entourés de leucocytes; mais la minorité seulement sont englobés; en forte majorité ils restent libres. L'englobement par les cellules endothéliales du foie est bien plus intense que dans les stades précédents. On observe de nombreuses cellules pigmentaires renfermant des bacilles, généralement en petit nombre.

Deux heures après, les bacilles ne se rencontrent plus guère dans l'intérieur des vaisseaux; on n'en voit plus qu'un nombre assez restreint; quelques-uns très rares, libres. La plupart des phagocytes sont des cellules pigmentaires.

Ainsi, 2 heures après l'inoculation, nous observons une disparition presque complète des microbes du foie, et nous voyons le rôle important des cellules endothéliales de cet organe.

Dans tous ces phénomènes, les éosinophiles semblent n'avoir

aucun rôle; ils sont en général très rares, bien plus rares que dans la rate où il ne se passe rien.

L'inoculation par la veine abdominale a un double inconvénient; elle chasse pour un temps le sang du foie et les microbes sont arrêtés dans cet organe. Aussi j'ai fait également des injections par la crosse aortique. Le bacille du charbon se trouve alors distribué également dans toutes les parties du corps.

De toutes les préparations examinées, je conclus que :

1^o Le foie a un rôle important dans la destruction des microbes.

Huit minutes après l'injection, on y trouve un petit nombre de microbes. Plus de la moitié de ces microbes sont intracellulaires; mais une bonne partie des phagocytes sont des cellules endothéliales; les microbes contenus dans ces cellules sont toujours en petit nombre. Il n'y a déjà plus de microbes dans les gros vaisseaux. Les éosinophiles peuvent déjà manifester leurs propriétés phagocytaires. Mais leur petit nombre indique qu'ils ne doivent avoir aucun rôle à jouer avant l'englobement des microbes par les microphages ordinaires ou par les macrophages.

A mesure que le moment de l'inoculation s'éloigne, le nombre des microbes libres dans le foie diminue. Déjà 20 minutes après, on n'en observe que rarement d'extracellulaires. Ils sont en minorité dans les leucocytes, en majorité dans les cellules pigmentaires. Mais il y a encore quelques microbes libres 1 heure après l'injection.

L'englobement ne va donc pas aussi vite que chez les animaux à sang chaud¹. Cela tient évidemment à ce que les propriétés chimiotactiques des leucocytes de la grenouille sont, comme l'a montré M. Gabritchewsky (13), bien moins puissantes que celles des globules blancs du lapin;

2^o Les coupes de rates, fixées 20 minutes ou 1 heure après l'injection, montrent très rarement des bacilles. En revanche, elles renferment des quantités d'éosinophiles;

3^o La moelle des os, prise une heure après l'injection, montre quelques microbes très rarement libres. Dans une coupe transversale de moelle de fémur, on compte en moyenne 2 microbes;

1. Voir le travail de M. Werigo (63), et celui de MM. Kanthack et Hardy (24).

4^o Enfin, il paraît y avoir dans le rein une sorte de rendez-vous de leucocytes chargés de microbes.

C'est dans la coupe d'un rein fixé 20 minutes après l'injection que nous avons observé les exemples les plus nets et les plus indiscutables de leucocytes éosinophiles renfermant des microbes à leur intérieur. Les figures 10 et 11 représentent deux de ces éosinophiles phagocytes. Dans ce rein, la moitié des phagocytes étaient des cellules à granulations.

Le premier fait à retenir de cette étude, c'est que la destruction des microbes dans le sang, ou mieux leur englobement par les phagocytes se fait très rapidement après leur entrée dans les vaisseaux.

Il a lieu incomparablement plus vite que dans le sac dorsal.

Cette constatation permet de répondre à une objection formulée par M. Klein (26) contre la théorie de la phagocytose. Il inocule des grenouilles dans le sac lymphatique dorsal, et il recherche les bacilles dans le sang et la rate depuis 10 minutes jusqu'à 24 heures après l'inoculation. Il constate ainsi que beaucoup de microbes disparaissent du sang dans les deux premières heures. Or, dit-il, la phagocytose n'a pu intervenir, puisqu'elle ne se manifeste jamais au point d'inoculation dans les trois premières heures. Mes expériences prouvent qu'elle se manifeste plus vite dans le sang, et les microbes que M. Klein ne retrouve plus ont dû disparaître par ce processus.

Un deuxième fait sur lequel j'appelle l'attention, et qui ressort non seulement de ces expériences d'injections intraveineuses, mais encore de celles sur les grenouilles à 33°, c'est le faible rôle de la rate dans la destruction des microbes.

Enfin, j'ai vu le rôle important des « pigmentzellen » dans la destruction des microbes injectés dans les vaisseaux. Ce rôle est bien moins grand quand les microbes sont inoculés dans le sac dorsal. Cela tient évidemment à ce que la plupart des leucocytes que l'on observe dans les coupes du foie, ont pris leurs microbes au point d'inoculation.

VII. — CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES ÉOSINOPHILES.

A Origine. — L'origine des cellules éosinophiles est encore bien obscure. M. Ehrlich (10) prétend qu'elles naissent dans la

moelle des os. Chez la grenouille, elles sont en effet particulièrement développées dans ces organes ; mais elles n'y sont pas plus nombreuses que dans la rate. En tout cas, il faut leur chercher une autre origine chez la raie, qui contient de nombreux éosinophiles et n'a pas de moelle des os.

Beaucoup d'auteurs tendent d'ailleurs à admettre que souvent elles dérivent de leucocytes polynucléaires à protoplasme hyalin. MM. Mâssart, Demoor et M^{lle} Everard (37), chez le cobaye et le lapin, ont montré tous les passages.

Et ainsi une autre question se pose : celle de savoir comment naissent les granulations.

Sont-elles un produit d'activité sécrétoire de la cellule, comme le veut M. Ehrlich, ou bien ont-elles une origine extracellulaire ?

Un certain nombre de faits nous semblent militer en faveur de cette seconde hypothèse.

M. Tettenhamer (58) a observé, chez des salamandres dont les testicules étaient en voie de dégénérescence, que « par la dégénérescence des noyaux des spermatocytes, il se forme, aux dépens de la chromatine, une substance acidophile. » Et de l'observation minutieuse des rapports entre cette substance acidophile et les leucocytes, il croit pouvoir conclure qu'elle pénètre à l'intérieur des globules blancs par phagocytose et y constitue des granulations α.

M. Tettenhamer note également que, dans les organes lymphoïques du cobaye, il a vu beaucoup de noyaux en dégénérescence et, dans ces noyaux, de la substance acidophile.

MM. Hardy et Lem Boon Keng (18), étudiant la réaction de la grenouille injectée avec du curare, remarquent qu'au second stade de la réaction, des globules rouges sont englobés par les leucocytes, et que ces débris de globules prennent l'éosine ; ils constituent ainsi dans les leucocytes des masses éosinophiles irrégulières.

M. Metchnikoff (4 et 46), chez des cobayes vaccinés contre le choléra, à qui il injecte des vibrions, a vu certains de ces vibrions se colorer en rose vif par l'éosine, au lieu de prendre la teinte bleue de méthylène. Il a également vu des granulations rangées de façon à rappeler exactement la forme d'un vibrion.

C'est évidemment là le 1^{er} stade de l'émiettement d'un vibron « éosinophilisé ».

Dans mes recherches sur le mode de résistance des *Lacerta viridis* à la bactéridie charbonneuse, j'ai constaté avec la plus grande netteté la transformation des microbes en granulations éosinophiles. Chez un lézard injecté sous la peau du cou, j'ai vu que, 24 heures après l'inoculation, la plus grande partie des microbes sont intracellulaires.

Parmi ces microbes, il en est à peine la moitié qui prennent la coloration bleue; on trouve toutes les gammes entre le bleu et le rouge. On saisit donc tous les stades de la transformation en éosinophiles de nos microbes.

La teinte violette indique que le microbe se colore à la fois par le bleu de méthylène et par l'éosine; il passe par le stade amphophile.

Dans les préparations colorées uniquement par l'éosine, une petite quantité de microbes sont colorés en rouge aussi foncé que les granulations « typiques; d'autres sont colorés en rose pâle : ce sont probablement des microbes qui prennent la teinte violette dans le cas d'une double coloration.

Dans l'exsudat du même lézard, 52 heures après l'inoculation, il n'existait plus guère que des microbes rose violacé et rouge franc.

Le stade d'émiettement du microbe est assez rare à observer. Cette transformation des microbes peut se produire assez vite. J'ai trouvé bon nombre de microbes ainsi transformés dans l'exsudat d'un lézard, 5 heures après l'injection dans le péritoine.

Malgré des observations répétées, je n'ai jamais constaté de phénomène semblable dans la destruction de la bactéridie par la grenouille.

La conclusion s'impose donc : dans un certain nombre de cas bien observés, les granulations éosinophiles proviennent de l'englobement par les phagocytes de matériaux présentant déjà ou non la réaction acidophile.

B. Nature et rôle des granulations. — Les opinions les plus diverses ont été émises sur la nature de ces granulations. Les anciens auteurs les considéraient, les uns comme des globules gras, les autres comme formés d'hémoglobine.

Des travaux de MM. J. Weiss (62), Lövit (29), Seisweilo, il

résulte que ces granules manifestent les réactions des matières albuminoïdes et en particulier des globulines.

MM. J. Weiss et Metchnikoff (43) ont d'ailleurs montré que les cristalloïdes des grains d'aleurone qui existent souvent dans les réserves végétales, prennent la couleur de l'éosine; il en est de même des granulations vitellines, d'après M. Ehrlich.

De ces analogies, il semble qu'on puisse conclure que les granulations éosinophiles sont des matières de réserve.

M. R. Heidenhain (49) a noté la diminution des cellules à granulations après des périodes de jeûne¹. Mais les preuves directes qu'on a bien affaire à des cellules de réserve ne sont pas encore suffisantes. Les anciennes opinions émises sur le rôle des granulations éosinophiles sont d'ailleurs abandonnées maintenant. M. Cuénot (5 et 6), en 1894, voulait voir, dans ces granules, le ferment albuminogène qui transforme les peptones du sang en albumine; et il regardait le globule blanc sans granules comme le terme de l'évolution de la cellule à granules.

En 1893, au contraire, M. Cuénot considère la cellule éosinophile de l'écrevisse comme le terme final de l'évolution du globule sanguin. Dans sa revue des opinions émises sur le rôle des granulations α , il ne cite plus que pour mémoire, et sans y insister autrement, son ancienne opinion.

Tout ce que nous savons maintenant nous permet de rejeter *a posteriori* le rôle bactéricide que veulent leur donner MM. Kanthack et Hardy.

Je puis résumer en deux propositions les faits que j'ai observés à ce sujet chez la grenouille :

1^o Dès que la leucocytose commence dans le sac lymphatique dorsal, (et quelquefois elle se manifeste une heure après l'inoculation), les leucocytes hyalins englobent des microbes;

2^o Dans les injections intravasculaires, et ceci est surtout net dans les injections par le cœur, la phagocytose des leucocytes et des macrophages fixes commence moins de 10 minutes après l'inoculation.

Dans les deux cas, il est difficile d'admettre que les microbes englobés aient déjà pu subir l'action des éosinophiles.

C. *Propriétés des cellules à granulations α* . — J'ai montré que

1. W. OKINTSCHITZ (*Arch. f. exp. Path.*, 31, 1893) note au contraire une légère augmentation quand le jeûne se prolonge.

dans un certain nombre de cas, c'est en manifestant des propriétés phagocytaires que les cellules se chargent de granules éosinophiles. Les cellules remplies de ces granulations ont-elles encore gardé quelques traces de leurs propriétés phagocytaires ?

Ces propriétés sont au nombre de trois :

- 1^o Chimiotaxie positive exercée par certaines substances ;
- 2^o Ingestion des microbes ou des matières étrangères ;
- 3^o Digestion de ces matières.

1^o Parmi les nombreux savants qui se sont occupés des variations dans la proportion des globules blancs du sang, concomitantes à certaines affections de l'organisme humain, un certain nombre se sont préoccupés des changements dans le nombre relatif des éosinophiles.

De ces travaux, pour la bibliographie desquels nous renvoyons au mémoire de M. Zappert (64) et à la revue critique de M. Metchnikoff (45), il ressort que les leucocytoses éosinophiles sont rares ; dans la plupart des cas de leucocytoses intenses, quand la proportion relative des phagocytes typiques augmente considérablement, celle des acidophiles varie peu.

Les éosinophiles manifestent donc une chimiotaxie moindre que les leucocytes hyalins. MM. Massart, Demoor et M^{lle} Everard (37) arrivent aux mêmes conclusions chez le cobaye et le lapin.

Les éosinophiles de la grenouille sont-ils doués de chimiotaxie positive ? MM. Kanthack et Hardy l'affirment et ils prétendent même que, dans les premiers temps qui suivent l'inoculation, il y a uniquement leucocytosé éosinophile.

Chez les nombreuses grenouilles que j'ai inoculées dans le sac dorsal, j'ai souvent compté le nombre des éosinophiles, et cela de 2 à 6 heures après l'inoculation, c'est-à-dire depuis le commencement de la leucocytose jusqu'après son maximum, et j'ai toujours trouvé la même proportion de ces cellules.

C'est seulement lorsque la phagocytose est déjà très avancée que la proportion des éosinophiles diminue. Dans la première période, cette proportion est variable avec les individus.

Pour les *Rana temporaria*, elle est en général comprise entre 10 et 25 0/0. Mais elle peut dépasser ce chiffre. Dans un lot de grenouilles recueillies aux environs de Paris à la fin du mois de mai 1894, elle était supérieure à 50 0/0 ; quelques-unes même

présentaient au point d'inoculation 80 éosinophiles contre 20 leucocytes hyalins. Chez les *Rana esculenta*, la proportion est bien moindre; souvent elle n'atteint pas 1 0/0; elle dépasse rarement 10 0/0.

Quoique je n'aie pas fait d'observation attentive sur ce point, j'ai gardé cette impression que la proportion des éosinophiles ne diminue pas pendant l'été.

Examinons maintenant les variations de cette proportion avec le temps qui suit l'inoculation et avec l'endroit de cette inoculation.

J'ai injecté des grenouilles à la fois dans le sac lymphatique dorsal et dans la chambre antérieure de l'œil. En ce second point, il n'y a pas normalement de leucocytes, et ces cellules ont une certaine difficulté à arriver. M. Metchnikoff a montré que la leucocytose ne commençait que 18 à 24 heures après l'inoculation. Auparavant, si la température n'est pas trop basse, il y a croissance des bactériidies. J'ai également constaté ces faits :

PROPORTION DES ÉOSINOPHILES

Inoculation du 31 mai à 2 heures du soir.

	PRISES DE LYMPHE	
	SAC DORSAL	OEIL
GRENOUILLE I. — (<i>R. temporaria</i>.)		
31 mai, 6 heures.....	76 0/0	—
1 ^{er} juin, 3 heures.....	42 0/0	35 0/0
2 juin, 6 heures.....	20 à 25 0/0	6 à 70 0/0
GRENOUILLE II. — (<i>R. temporaria</i>.)		
31 mai, 6 heures.....	67 0/0	—
1 ^{er} juin, 3 heures.....	40 0/0	44 0/0
2 juin, 6 heures.....	25 0/0	29 0/0
GRENOUILLE III. — (<i>R. esculenta</i>.)		
31 mai, 6 heures.....	44 0/0	—
1 ^{er} juin, 2 heures.....	—	2 0/0
2 juin, 3 heures.....	—	2 0/00

Il est clair que les nombres pour l'œil doivent être comparés aux nombres de la veille pour le sac dorsal, puisque les leucocytes mettent environ 1 jour à pénétrer dans la chambre antérieure de l'œil.

La proportion des éosinophiles est donc notablement moindre les jours qui suivent celui de l'inoculation; j'ai bien à ce sujet une trentaine d'observations toutes concordantes; les expériences citées donnent une idée de la diminution relative des éosinophiles. Il y a également proportion moindre quand on observe le phénomène dans la chambre antérieure de l'œil.

Il m'a semblé que ces faits pouvaient s'expliquer en admettant que les éosinophiles ont un pouvoir chimiotactique moindre que les phagocytes ordinaires. La substance attirante au point d'inoculation diminue en effet à mesure que le moment de l'inoculation s'éloigne. Et, dans la chambre antérieure de l'œil, cette substance est en moins grande quantité que dans le sac dorsal; de plus, la difficulté de pénétration des leucocytes doit être un obstacle à la manifestation de leurs propriétés chimiotactiques.

Pour vérifier l'exactitude de cette hypothèse, j'ai cherché si la proportion des éosinophiles attirés dans le sac dorsal varie :

1^o Avec la quantité de virus charbonneux inoculée;

2^o Avec sa qualité.

Pour chaque série, on opérait avec deux 2 lots de grenouilles; chaque lot recevait :

1 ^{re} SÉRIE	1 ^{er} LOT	II ^e LOT
D'abord.	1 goutte de charbon.	1/2 cm. cube.
10 jours après.	1/2 cm. cube.	1 goutte.
II ^e SÉRIE	1 ^{er} LOT	II ^e LOT
D'abord.	1/2 cm. cube. 1 ^{er} vaccin.	1/2 cm. cube charbon virulent.
12 jours après.	Charbon virulent.	1 ^{er} vaccin.

Les expériences étant disposées de cette façon, les variations dans le nombre des éosinophiles dues soit à l'influence du jeûne, soit à celle d'une première inoculation, soit à toute autre cause, se trouvent annulées.

Avec les 10 grenouilles qui ont servi à ces expériences, j'ai obtenu 8 résultats conformes à mon hypothèse; dans 2 cas, le nombre des éosinophiles n'a pas varié. Je crois donc, de cet ensemble de faits, pouvoir conclure que les éosinophiles de la grenouille ont un pouvoir chimiotactique très net, mais moindre que celui des leucocytes à protoplasme hyalin.

Le pouvoir chimiotactique des leucocytes du lézard est également considérable. Sur des lézards expérimentés en septembre

et octobre 1894, j'ai compté en moyenne 80 0/0 d'éosinophiles au point d'inoculation. Chez un individu, ce nombre a même atteint 90 0/0. — Chez un autre, il n'a été que de 50 0/0.

Chez les reptiles, les éosinophiles sont d'ailleurs très nombreux dans le sang. M. Saint-Hilaire l'a déjà constaté chez la couleuvre.

2° *Les éosinophiles ingèrent des microbes.* — J'ai déjà, dans les paragraphes précédents, noté le fait chez la grenouille.

Il suffira de le rappeler ici, en répondant à deux objections possibles. MM. Kanthack et Hardy disent n'avoir jamais vu de microbes dans les éosinophiles de grenouille. — Ils insistent sur ce fait que souvent les microbes sont collés à la surface des éosinophiles, et qu'à un examen superficiel, on peut croire qu'ils sont à leur intérieur.

J'ai moi-même été frappé de ce fait que souvent les microbes sont à côté des éosinophiles, et non dedans. Mon interprétation diffère de celle des savants anglais. Pour moi, grâce à ses propriétés chimiotactiques, le leucocyte s'est approché du microbe; il n'a pu l'englober, déjà rempli qu'il est de matières nutritives. Mais il est des cas où l'ingestion a lieu. Je l'ai maintes fois observé dans l'exsudat lymphatique dorsal; et j'ai cité le cas d'une grenouille inoculée par le bulbe aortique, où le phénomène était d'une grande fréquence dans le foie, et surtout le rein.

MM. Hardy et Lem Boon Keng notent qu'au second stade de la réaction des grenouilles contre le curare et le charbon, beaucoup de leucocytes à protoplasme hyalin englobent des éosinophiles, se les assimilent peu à peu et finalement prennent tout à fait l'apparence d'un éosinophile typique. Et pourtant, disent les auteurs, ces cellules conservent leurs propriétés phagocytaires.

Il me semble que les leucocytes hyalins parvenus à cet état sont de véritables éosinophiles, et que le fait qu'ils absorbent des matières étrangères plaide en faveur de l'idée que je soutiens.

Mais les éosinophiles dont j'ai constaté le pouvoir phagocytaire, sont probablement des éosinophiles de plus ancienne date que ceux de MM. Hardy et Lem Boon Keng. Je les ai en effet observés dès les premiers temps de la phagocytose dans le

sac dorsal, et 8 minutes après l'injection par le bulbe aortique, dans le foie: les phénomènes pathologiques décrits par MM. Hardy et Lem Boon Keng n'avaient pas encore pu se produire. D'ailleurs, l'observation du noyau montrait qu'on avait affaire à une cellule unique.

Cette propriété des éosinophiles est, je l'ai dit, peu accusée. On doit la considérer comme un reste des propriétés phagocytaires des cellules qui ont mis en réserve les granulations acido-philés.

Les éosinophiles du lézard ont aussi le pouvoir d'englober des microbes (fig. 22). Et bien que j'aie fait à ce sujet peu d'observations, je crois que ces cellules jouissent, à ce point de vue, des mêmes propriétés que celles de grenouille.

3° *Les cellules éosinophiles digèrent-elles les microbes ?* — On s'accorde à reconnaître qu'il est bien difficile d'observer avec certitude les stades de digestion des microbes à l'intérieur des phagocytes. Cette difficulté se complique, chez les éosinophiles, de ce que ces granulations, masquent en partie les microbes englobés.

Je n'ai rien observé, à ce point de vue, chez la grenouille. Chez le lézard, j'ai vu des microbes, indubitablement absorbés par des cellules à granulations, montrer de l'affinité pour l'éosine (fig. 23).

C'est là une preuve qu'une transformation des microbes a lieu à l'intérieur des éosinophiles. La digestion peut-elle être complète? C'est ce qu'il nous est impossible de dire.

— En résumé, je crois que les éosinophiles sont d'anciens phagocytes, bourrés de matières de réserve, et qui possèdent encore quelques restes de leurs propriétés phagocytaires.

La différence la plus importante entre les éosinophiles et les pseudo-éosinophiles tombe donc. — Il est probable que ces deux sortes de granulations représentent 2 stades de l'évolution ou de la transformation d'une même matière albuminoïde. C'est d'ailleurs à cette conclusion que tendent les recherches de MM. Ehrlich et Schwarze (pour M. Ehrlich, ces granulations ne diffèrent chimiquement que par la teneur en eau); et aussi celles de MM. Massart, Demoor et M^{lle} Everard, et de M. Cantacuzène, qui, chez le lapin et le cobaye, trouvent tous les passages entre ces deux sortes de granulations.

Chez l'homme, où les éosinophiles existent avec les neutrophiles, MM. Max Schultze, Ehrlich, H.-F. Müller, Maragliano et Zappert¹ ont observé également tous les passages entre ces deux sortes de cellules.

Les cellules à granulations α , β et ϵ d'Ehrlich ne diffèrent donc que par des détails secondaires ; MM. Kantack et Hardy proposent, avec raison, de réunir ces trois sortes de granulations sous le nom de granules *oxyphiles* ; et je crois, avec beaucoup de mes devanciers, que les granulations éosinophiles représentent le stade ultime de ces sortes de corps.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

I. Les poissons téléostéens résistent à la bactériémie charbonneuse par le processus phagocytaire. La lymphe du poisson n'a ni propriétés bactéricides, ni propriétés atténuantes. Les cellules à granulations sont en nombre nul ou insignifiant chez ces poissons.

II. La grenouille, chez qui les éosinophiles sont quelquefois très abondants, résiste au charbon de la même façon que les poissons. Elle lutte également au moyen de ses phagocytes, englobant les microbes vivants et virulents, contre la septicémie des souris.

III. A 35°, la grenouille a encore l'immunité contre le charbon ; la destruction de la bactériémie s'effectue comme à 20°. Mais chez les grenouilles qui meurent moins de 2 ou 3 jours après l'inoculation, par suite de la paralysie des leucocytes, les microbes encore vivants se développent abondamment dans le sang et les organes.

IV. Les microbes introduits directement dans le sang sont saisis bien plus tôt que ceux déposés dans le sac dorsal. — Les macrophages du foie jouent un rôle important dans cette destruction.

V. Les éosinophiles de la grenouille et du lézard sont doués de chimiotaxie positive, moindre que celle des phagocytes ordinaires ; ils englobent des microbes.

Les cellules à granulations du lézard sont au moins capables de commencer la digestion des bactéries englobées.

1. Cités d'après Zappert.

EXPLICATION DE LA PLANCHE V

Tous les dessins sont faits à la chambre claire. Grossissement Leitz Oc. 4. I. H. 4/12. Les préparations étaient colorées à l'éosine, bleu de méthylène, à l'exception de celles contenant les leucocytes figurés en 10 et 11. — Ils proviennent d'un rein de grenouille fixé à l'alcool absolu et coloré au Gram suivi du liquide de Biondi-Heidenhain (les couleurs ont été changées).

Fig. 1, 2 et 3. — Leucocytes de *Gobio fluviatilis*.

Fig. 4 et 5. — *Id.* avec microbes du charbon.

Fig. 6 et 7. — Leucocytes de *Perca fluviatilis* avec microbes du charbon.

Fig. 8. — Leucocyte à noyau multilobé de *Rana temporaria*.

Fig. 9. — Éosinophile de *R. temporaria*.

Fig. 10 et 11. — Éosinophiles du sang de rein (*R. esculenta*) contenant à leur intérieur des bacilles charbonneux.

Fig. 12 et 13. — Leucocytes de *Rana temporaria* contenant à leur intérieur des bacilles de la septicémie des souris (proviennent du sac dorsal 5 heures après l'injection).

Fig. 14. — Leucocyte de *R. temporaria* contenant un petit nombre de granulations et quelques bacilles de la septicémie (3 heures après l'inoculation).

Fig. 15 et 16. — Bacilles de la septicémie intracellulaires montrant des phénomènes de dégénérescence (29 heures après l'inoculation).

Fig. 17. — Éosinophile de *Lacerta viridis*.

Fig. 18. — Leucocyte de *L. viridis* avec quelques microbes.

Fig. 19 et 20. — *Id.* avec microbes à divers stades de transformation.

Fig. 21. — Leucocyte de *L. viridis* avec quelques granulations contenant 2 microbes colorés uniquement par l'éosine.

Fig. 22. — Éosinophile de *L. viridis* avec une chaîne de bacilles charbonneux.

Fig. 23. — *Id.* (Les microbes ont pris la teinte de l'éosine.)

BIBLIOGRAPHIE

1. BAUMGARTEN. — Beiträge zur pathologischen Mykologie. — Experimentelle Arbeiten über die Bedeutung der « Phagocyten » für Immunität und Heilung. (*Centr. für Kl. Med.*, n° 29, 21 juill. 1888, p. 513.)
2. Id. — Ueber das « Experimentum crucis » der Phagocytenlehre. (*Ziegler's Beiträge*, 7, p. 3.)
3. BITTER. — Kritische Bemerkungen zu E. Metschnikoff's Phagocytenlehre. (*Zeitschr. f. Hyg.*, 4, 1888, p. 318-353.)
4. CANTACUZÈNE. — *Recherches sur le mode de destruction du vibron cholérique dans l'organisme*. Paris, 1894.
5. CUÉNOT. — Études sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale (1^{re} partie, Vertébrés). (*Arch. zool. exp. et gén.*, 2^e série, 7, 1894, p. 1.)
6. Id. — Id. (2^e partie, Invertébrés). (*Arch. zool. exp. et gén.*, 9, 1894, p. 13, 365 et 593.)
7. Id. — Études physiologiques sur les gastéropodes pulmonés. (*Arch. de biologie*, 12, 1892, pl. XXIII.)
8. Id. — Études physiol. sur les crustacés décapodes. (*Arch. de biol.*, 13, 1893, p. 245, pl. XI-XIII.)
9. DUCLAUX. — Sur les théories de l'immunité. (*Revue critique. Ann. Inst. Pasteur*, 2, 1888, p. 494.)
10. EHRLICH. — *Farbenanalytische Untersuchungen*, etc. Berlin, 1891.
11. FAHRENHOLTZ. — Beiträge zur Kritik der Metschnikoff'schen Phagocytenlehre auf Grund eigener Infektionsexperimente mit Milzbrandsporen am Frosch. (*Inaugural. Dissertation*. Königsberg i. P. 22 mars 1889.)
12. FISCHER. — Untersuchungen über die Milzbrandinfection bei Froschen und Kroten. (*Fortsch. der Med.*, 9, n° 2, 15 janv. 1891, p. 45-61, pl. I.)
13. GABRITCHEWSKY. — Sur les propriétés chimiotactiques des leucocytes. (*Ann. Inst. Pasteur*, 4, 25 juin 1890, p. 346.)
14. DE GIAXA. — Ueber das Verhalten einiger pathogener Mikroorganismen im Meerwasser. (*Zeitschr. f. Hyg.*, 6, 1889, p. 162-224.)
15. GIBIER. — De l'aptitude communiquée aux animaux à sang froid à contracter le charbon par l'élévation de leur température. (*C. R. Ac. Sc. Paris*, 94, 1882, p. 1603.)
16. HANKIN. — Ueber den Ursprung und Vorkommen von Alexinen im Organismus. (*Centr. f. Bakt. und Paras.*, 12, nos 22 et 23, décembre 1892, p. 777 et 809.)
17. Id. — Ueber die Theorie des Alexocyten. (*Centr. f. Bakt. und Par.*, 14, n° 25, 23 décembre 1893, p. 832.)

18. HARDY ET LEM BOON KENG. — On the changes in the number and character of the wandering cells of the Frog induced by the presence of urari or of Bac. anthracis. (*The Journal of. Physiology* (Cambridge), 15, 1894, p. 361-375, pl. XI.)

18 bis. R. HEIDENHAIN. — Beiträge zur Histol-und Physiol. des Dünndarmschleimhaut. (*Archiv. für die gesammte Phys.*, 1888, suppl. Hefte.)

19. HESS. — Untersuchungen zur Phagocytenlehre. (*Virchow's Archiv.*, 109, 1887, p. 365, pl. XI.)

20. HUEPPE. — Bemerkungen zu Petruschky's Mittheilung in n° 12 d. *Zeitschrift über den Verlauf der Phagocyten controverse* (*Fortschr. der Med.*, n° 13, 1^{er} juill. 1890, p. 492.)

21. HUEPPE. — Neuere Arbeiten über Abschwächung von Micro-organismen und Immunität. (*Fortschr. d. Md.*, 1^{er} mai 1890, p. 355.)

22. KANTHACK. — Immunity, Phagocytosis and Chemotaxis. (*British Md. Journal*, 5 novembre 1892.)

23. KANTHACK ET HARDY. — On the characters and behaviour of the wandering (migrating) cells of the Frog, especially in relation to micro-organisms. (Comm. prélim. dans *Proc. of the Roy. soc. of. London*, 52, 1^{er} novembre 1892, p. 267, et *Phil. Trans.*, 185, 1894, p. 279-318.)

24. Id. — The morphology and distribution of the wandering cells of mammalia. (*The Journal of Physiology* (Cambridge), 17, 1894, p. 81. pl. II.)

25. KLEIN ET COXWELL. — Ein Beitrag zur Immunitätsfrage. (*Centr. für Bakt. und Par.*, 11, 1892, p. 464.)

26. KLEIN ET HAMER. — Ein weiterer Beitrag zur Immunitätsfrage. (*Centr. f. Bakt. und. Par.*, 11, 1892, p. 598.)

27. KOCH. — Untersuchungen über Bakterien. V. Die Aetiologie der Milzbrandkrankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bac. anthracis. (*Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 2, 1876, p. 277-311, pl. XI.)

28. KOWALEWSKY. — Etudes expérimentales sur les glandes lymphatiques des Invertébrés. (Comm. prélim. Mém. biol. tirés du *Bull. de l'Acad. impériale des sciences de Saint-Petersbourg*, 13, p. 437, 10 novembre 1893.)

29. LÖVIT. — Ueber Neubildung und Beschaffenheit der weissen Blutkörperchen. (*Beiträge zur path. anatomie*, 10, 1891, p. 213, pl. XIII-XV.)

30. LUBARSH. — Ueber Abschwächung der Milzbrandbacillen im Froschkörper. (*Fortschr. d. Med.*, 6, 1888, p. 121-130.)

31. Id. — Ueber die Bedeutung der Metchnikoff'schen Phagocyten für die Vernichtung der Milzbrandbacillen im Froschkörper. (*Tagebl. der 61 Naturforscher Versammlung in Köln*, 1888.)

32. Id. — Ueber die bakterienvernichtenden Eigenschaften des Blutes und ihre Beziehungen zur Immunität. (*Centr. f. Bakt. und. Par.*, 6, 1889, nos 19-20, p. 481 et 529.)

33. Id. — Ueber Bakterienvernichtung im Froschkörper. (*Fortschr. der Med.*, 8, 1890, n° 3, p. 87.)

34. Id. — Ueber die Ursachen der Immunität. (*F. der M.*, 8, 1^{er} septembre 1890, p. 665.)

35. ID. — Untersuchungen über die Ursachen der angeboren und erworbenen Immunität. (*Zeitschr. f. Kl. Med.*, 18 et 19, 1891.)

36. ID. — Ueber Immunität und Schutzimpfung. (*Thiermedizinische Vorträge*, 2 avril 1892.)

37. MASSART, DEMOOR ET EVERARD. — Sur les modifications des leucocytes dans l'infection et dans l'immunisation. (*Ann. Inst. Pasteur*, 7, 1894, p. 165, pl. I.)

38. METCHNIKOFF. — Ueber die Beziehung der Phagocyten zu Milzbrandbacillen. (*Virchow's Archiv.*, 97, 1884, p. 502-527, pl. XVI et XVII.)

39. ID. — Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. (*Ann. Inst. Pasteur.*, I, 1887, p. 321-337.)

40. ID. — Ueber das Verhalten der Milzbrandbacillen im Organismus. (*Virchow's Archiv.*, 114, décembre 1888, p. 465-493.)

41. ID. — Etudes sur l'immunité. — I. Immunité des lapins contre le bacille du rouget des porcs. (*Ann. Inst. Pasteur*, 3, 1889, p. 289, fig. 9.)

42. ID. — Deux travaux du laboratoire de M. Baumgarten dirigés contre la théorie des phagocytes. (*Ann. Inst. Pasteur*, 4, 1890, p. 35.)

43. ID. — Préface de l'édition anglaise de la pathologie comparée de l'inflammation.

44. ID. — L'immunité dans les maladies infectieuses. (*Semaine médicale*, 12, n° 59, 26 nov. 1892, p. 469.)

45. ID. — La théorie des alexocytes. (*Revue critique. Ann. Inst. Pasteur*, 7, 1893, p. 50.)

46. ID. — Réponse à quelques critiques de la théorie des phagocytes (*Revue critique. Ann. Inst. Pasteur*, 8, 1894, p. 58.)

47. ID. — L'état actuel de la question de l'immunité. (*Rapport au Congrès international de Buda-Pest. Ann. Inst. Pasteur*, 8, 1894, p. 706.)

48. NUTTALL. — Experimente über die bakterienfeindlichen Einflüsse des thierischen Körpers. (*Zeitschr. f. Hyg*, 4, 1888, p. 352, pl. IV.)

49. ID. — Beiträge zur Kenntniss der Immunität. (*Inaug. Dissert.* Göttingen, 1890.)

50. OGATA ET JASUHARA. — Dans les *Mittheilungen d. med. Fakultät der Kaiserl. jap. Universität Tokio*, 1, n° 4. (Cité d'après l'analyse de Loeffler dans *Centr. f. Bak. und. Par.*, 9, 1891, p. 25.)

51. PETRUSCHKY. — Untersuchungen über die Immunität des Frosches gegen Milzbrand (*Inaug. Dissert.* Iéna, 1888 et *Ziegler's Beiträge*, 3, 1888, p. 337-387.)

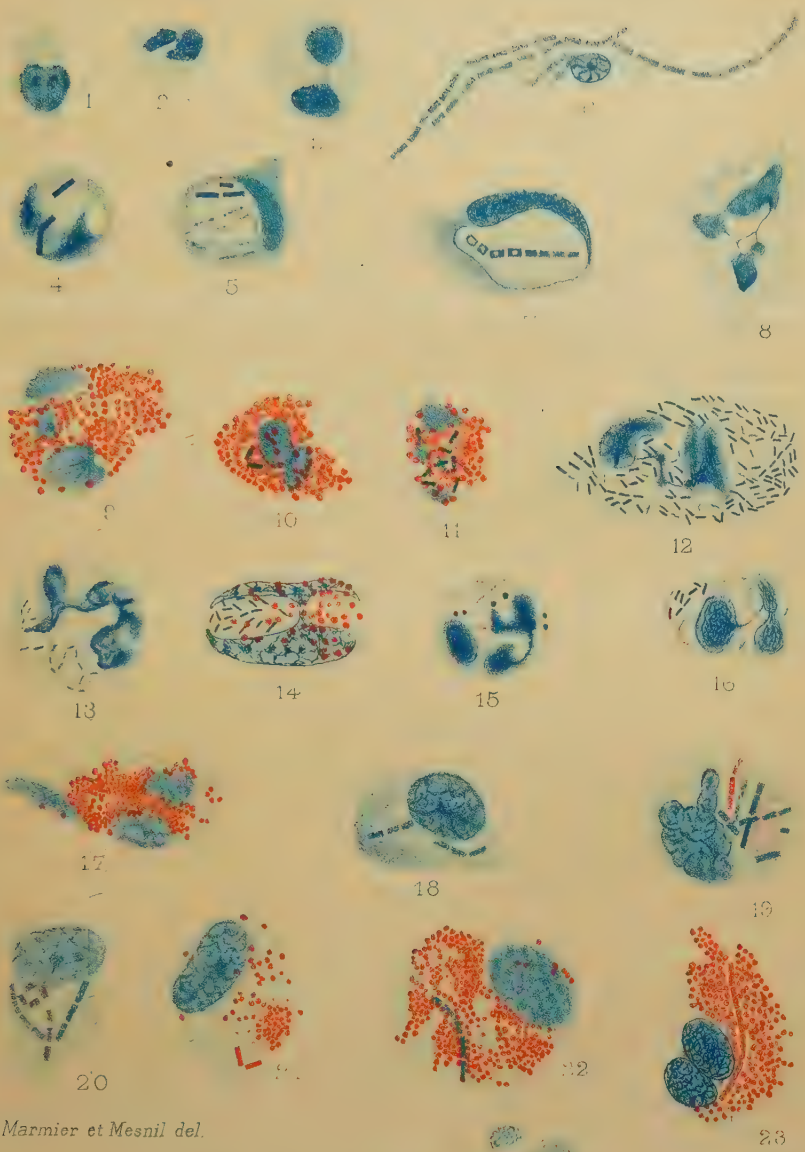
52. ID. — Die Einwirkungen des lebenden Froschkörpers auf den Milzbrandbacillus. (*Zeitschr. f. Hyg.*, 7, 1889, p. 75, pl. I.)

53. ID. — Der Verlauf der Phagocytencontroverse. (*Fortschr. d. Med.*, 15 juin 1890, p. 449.)

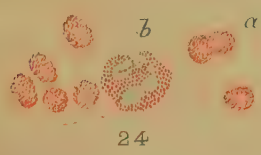
54. ROHRSCHEIDER. — Experimentelle Untersuchungen über die bei Froschen durch Verweilen in höherer Temperatur erzeugte Disposition für Milzbrand. (*Ziegler's Beiträge*, 9, 1891, p. 515-523.)

55. ROUDENKO. — Influence du sang de grenouille sur la résistance des souris contre le charbon. (*Ann. Inst. Pasteur*, 5, 1891, p. 515-517.)

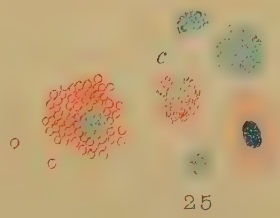
56. SABRAZÈS ET COLOMBOT. — Action de la bactériodie charbonneuse sur un poisson marin, l'hippocampe. (*Ann. Inst. Pasteur*, 8, 1894, p. 696.)
57. SANARELLI. — Le cause dell'immunità naturale contre il carbonchio. (*Rivista d'Igiene e sanità pubblica*, anno 2, n° 3, 1^{er} février 1894, et en allemand dans : *Centr. f. Bakt. und Par.*, 9, 1894, p. 467, 497 et 532.)
58. TETTENHAME. — Ueber die Entstehung der acidophilen Leukocytengranula aus degenerirender Kernsubstanz. (*Anat. Anz.*, 8, 1893, p. 223.)
59. TRAPEZNIKOFF. — Du sort des spores de microbes dans l'organisme animal. (*Ann. Inst. Pasteur*, 3, 1894, p. 362-395, pl. X et XI.)
60. VOSWINKEL. — Ueber Bakterienvernichtung im Froschkörper. (*Fortschr. der Med.*, 8, 1890, p. 9.)
61. WAGNER. — Le charbon des poules. (*Ann. Inst. Pasteur*, 4, 1890, p. 570.)
62. J. WEISS. — Ein neue mikrochimische Reaction der eosinophile Zellen (Ehrlich). (*Centr. für die medicin. Wissensch.*, 1891.)
63. WERIGO. — Les globules blancs protecteurs du sang. (*Ann. Inst. Pasteur*, 6, 1892, p. 478.)
64. ZAPPERT. — Ueber das Vorkommen der eosinophilen Zellen im menschlichen Blute. (*Zeitschr. für klin. Med.*, 23, 1892, p. 227.)
-



Marmier et Mesnil del.



Tschernodanoff del.



V Roussel lith.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Géologie. — Les mers tertiaires en Bretagne et dans le Cotentin.

Botanique. — Morphologie des Bactériacées.

Vu et approuvé,

Paris, le 7 mai 1895.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,

G. DARBOUX.

Vu et permis d'imprimer,

Paris, le 7 mai 1895.

LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,

GRÉARD.

SCEAUX. — IMPRIMERIE CHARAIRE ET C^{ie}.
